

University of Groningen

Thymus-afhankelijkheid van de humorale immuun-reaktie.

Mulder, Nanno Harrie

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1972

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Mulder, N. H. (1972). *Thymus-afhankelijkheid van de humorale immuun-reaktie.* [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

**THYMUS-AFHANKELIJKHEID VAN DE
HUMORALE IMMUN-REAKTIE**

Thymus dependency of the antibody response

N. H. MULDER

THYMUS-AFHANKELIJKHEID VAN DE
HUMORALE IMMUUN-REAKTIE

THYMUS DEPENDENCY OF THE ANTIBODY RESPONSE

STELLINGEN

I.

Afwijkingen in het T-cellen systeem kunnen tot een zowel cellulair als humoraal afwijkende immuniteit leiden.

II.

Bloedlymfocyten zijn bij de mens voornamelijk T-cellen.

III.

Veranderingen in het oppervlak van een cel kunnen leiden tot kwaadaardige nieuwgroei.

(BURGER, Nature, 1970, 227, 170).

IV.

Wanneer een recirculerende cel van oorzakelijk belang is bij het ontstaan van het morfologische beeld van de Morbus-Hodgkin, is de vraag of dit beeld multifocaal of metastatisch ontstaat minder relevant.

V.

Het gebruik van β blokkeerders voor de behandeling van essentiële hypertensie is weinig rationeel.

VI.

De passieve haemagglutinatie-reaktie berust niet op agglutinatie.

VII.

Er lijken aanwijzingen voor te bestaan dat een cardiogene shock kan worden behandeld met een snelle, zeer hoog gedoseerde corticosteroïed toediening.

(MOTSAY c.s., Fed. Proc., 1970, 29, 1861).

VIII.

Er zijn weinig argumenten tegen een actieve medikamenteuze leiding van het nageboortetijdperk.

IX.

Er zijn sterke aanwijzingen dat homosexualiteit bij de man gepaard gaat met een hormonale afwijking.

X.

Er bestaat een grote invloed van modeverschijnselen op diagnostiek en therapie in de geneeskunde.

XI.

Scheiding van kuratieve en preventieve geneeskunde is meestal een eufemisme voor een inadekwate geneeskunde.

XII.

De keuze van eenheden in de klinische chemie moet in de eerste plaats bepaald worden door het internationale gebruik.

XIII.

Wie onderwijs in de geneeskunde beschouwt als vakonderricht zal artsen afleveren die niet hebben geleerd hun snel verouderende kennis aan te vullen.

XIV.

De mening dat Noord-Nederland geïndustrialiseerd moet worden berust op een vooroordeel.

N. H. MULDER

17 mei 1972



RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

THYMUS-AFHANKELIJKHEID VAN DE HUMORALE IMMUUN-REAKTIE

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van het doctoraat in de geneeskunde
aan de Rijksuniversiteit te Groningen
op gezag van de Rector Magnificus Dr. A. Wattel,
in het openbaar te verdedigen op woensdag 17 mei 1972
des namiddags te 2.45 uur precies

door

NANNO HARRIE MULDER

geboren te Noordbroek

1972

DRUKKERIJ VAN DENDEREN
GRONINGEN

Promotor: Prof. Dr. F. J. KEUNING
Co-Referent: Prof. Dr. E. MANDEMA

Aan dit onderzoek werd financieel bijgedragen door de Stichting voor Fundamenteel Geneeskundig Onderzoek (FunGo).

Dit onderzoek werd verricht in het Histologisch Laboratorium (hoofd: Prof. Dr. F. J. Keuning).

De bestralingen werden uitgevoerd in de afdeling Radiopathologie (hoofd: Prof. Dr. H. B. Lamberts).

Zonder de kritische en vaardige hulp van mevr. M. J. C. Osinga-Meek zou dit onderzoek niet zijn afgemaakt. De heer J. Feringa was onmisbaar bij de operaties. Mej. N. Visser ontcijferde het manuscript, de heer M. van der Zee tekende de grafieken.

Een aantal experimenten werden uitgevoerd in samenwerking met de heren W. Jansen en M. J. de Boer, student-assistenten in dit laboratorium.

Tenslotte dank ik de staf van het Histologisch Laboratorium, in het bijzonder dr. J. E. Veldman, voor de wetenschappelijke en persoonlijke zorg aan mij besteed.

INHOUD

Inleiding	1
<i>Hoofdstuk I</i>	
Immunologische reacties en immunocompetente cellen	2
T-cellen	2
B-cellen	4
<i>Hoofdstuk II</i>	
Materiaal en methoden	18
<i>Hoofdstuk III</i>	
IgG synthese in de primaire reactie	21
<i>Hoofdstuk IV</i>	
Operationele definiëring van de secundaire reactie	53
<i>Hoofdstuk V</i>	
Celinteractie in memoryvorming en secundaire reactie	70
Samenvatting	93
Thymus dependency of the antibody response	99
Literatuurlijst	112

INLEIDING

Tot de meest elementaire eigenschappen van het immunologische systeem behoort het vermogen van dat systeem om onderscheid te maken tussen antigenen en lichaameigenstoffen en tussen antigenen onderling. In het organisme wordt dit immunologische systeem gerepresenteerd door het lymfoïde apparaat, het onderscheidingsvermogen, de „specificiteit”, is een eigenschap van de meest karakteristieke vertegenwoordigers van dat apparaat, de lymfocyten. Het kompleks van reakties dat door een antigeen in deze cellen wordt geïnduceerd kan via twee wegen leiden tot een eliminering van het antigeen. Een van die effektormechanismen vormt de humorale immuniteit: de vorming van circulerende antilichamen van verschillende klassen.

Door het langdurig circuleren van antilichamen uit met name de IgG klasse, kan een toestand van „immuniteit” ontstaan; een hernieuwd kontakt met een pathogeen antigeen leidt dan niet tot ziekteverschijnselen. In een aantal gevallen leidt overigens juist de aanwezigheid van circulerende antilichamen in dergelijke situaties tot het optreden van ziekteverschijnselen. Ook in een immuun dier resulteert een tweede kontakt met het antigeen meestal in een humorale reactie, die dan op karakteristieke wijze verloopt: de secundaire reactie. Dit karakteristieke verloop is een gevolg van de „memory” die na het eerste kontakt met het antigeen is opgebouwd.

Een tweede effektormechanisme van het immunologische apparaat is de cellulaire immuniteit: de vorming van lymfocyten - „killer cellen” - die specifiek gericht zijn tegen een bepaald antigeen. Deze twee reaktiepatronen van het lymfoïde apparaat zijn lange tijd als totaal gescheiden systemen beschouwd. Recente onderzoeken (CLAMAN c.s. 1966, MILLER en MITCHEL 1968) hebben echter aangetoond, dat tussen deze twee systemen een vorm van samenwerking bestaat.

De betekenis van deze samenwerking voor de IgG synthese in primaire en secundaire reactie en voor de memory vorming, vormt het onderwerp van deze studie.

IMMUNOLOGISCHE REAKTIES EN
IMMUNO-COMPETENTE-CELLEN

T-cellen

Immunologische reacties spelen zich af in het lymfoïde systeem. Dit systeem wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van lymfocyten, een zowel functioneel, als morfologisch zeer heterogene celpopulatie, waartoe ook die cellen behoren die immunologische reacties kunnen uitvoeren. Over deze celgroep werd veel informatie verkregen door experimenten die het mogelijk maakten herkomst en eigenschappen van cellen te relateren aan functies. Tot de meest vruchtbare van deze experimenten behoorden die, welke de betekenis van de thymus voor de immunologische competentie tot onderwerp hadden. In deze experimenten werd een groep cellen gedefinieerd die worden aangeduid als: „T-cellen”.

Neonatale thymectomie in de muis leidde, in het eenmaal volwassen geworden dier, tot zowel functionele als morfologische veranderingen in het lymfoïde systeem. De uitstoting van een allograft (MILLER 1961, 1962; ARNASON c.s. 1962), en de "delayed type" huidreactie (ARNASON c.s. 1962; JANKOVIC c.s. 1962; PARROTT c.s. 1966) waren onmogelijk geworden maar ook de humorale reactie was soms gestoord (MILLER 1962, a.b. 1963, 1964).

De morfologische veranderingen na neonatale thymectomie bestonden in de eerste plaats uit een vermindering van het aantal cellen. WAKSMAN c.s. (1962) en PARROTT c.s. (1966) stelden vast, dat deze celdepletie beperkt was tot bepaalde welomschreven regionen van de lymfoïde organen: „de thymus afhankelijke gebieden”. Hiertoe behoren o.a. de paracorticale velden in de lymfklieren en de peri-arteriolaire lymfocytenscheden in de milt. Dezelfde functionele en morfologische afwijkingen ontstaan na thymectomie op volwassen leeftijd, wanneer deze wordt gekombineerd met een in principe letale bestra-

ling (MILLER 1963, 1964; GLOBERON c.s. 1962; AUERBACH c.s. 1963; CROSS c.s. 1964; KEUNING en VAN DEN BROEK 1968).

De bovengenoemde waarnemingen over het effect van thymectomie, passen bij de hypothese dat immunocompetente cellen uit de thymus migreren naar de thymus afhankelijke gebieden. De migratie uit de thymus kon worden vastgesteld door gebruik te maken van een thymustransplantaat, waarvan de cellen aan het T 6 chromosoom herkenbaar waren (MILLER 1963, HARRIS en FORD 1963, 1964), ofwel door de thymus in vivo te labelen (WEISSMAN 1967). Na toediening van een antigeen (schapenerythrocyten) bleken dergelijke uit de thymus afkomstige cellen een sterke proliferatie te vertonen (LEUCHARS c.s. 1964, 1965; DAVIES c.s. 1966; LEUCHARS c.s. 1966). MILLER en MITCHELL (1969) toonden aan dat deze proliferatie leidde tot de vorming van kleine, recirculerende, lymfocyten. De cellen die bij dit proces betrokken zijn bleken geen antilichamen te vormen (DAVIES c.s. 1967, MILLER en MITCHELL 1968).

De bovenbeschreven overgang van prolifererende blastachtige cellen naar kleine lymfocyten, komt overeen met de waarnemingen van Gowans over de cellen die betrokken zijn bij de specifiek cellulaire „graft versus host reactie” (GOWANS en MCGREGOR, 1965). De direkte funktionele betekenis van de uit de thymus afkomstige cellen was moeilijker vast te stellen. In neonataal gethymectomeerde muizen hadden thymocyten, wanneer die tegelijk met het antigeen werden gegeven (10^7 cellen) een goed substituerend vermogen, t.a.v. de antilichaamproduktie tegen schapenerythrocyten (MILLER en MITCHELL 1968). In andere situaties waren thymocyten in grote aantallen ($2 \cdot 10^8$ cellen) tot een goede substitutie in staat, (YUNIS c.s. 1964), in kleinere aantallen echter slechts in geringe mate (TRAININ c.s. 1965).

Andere direkte aanwijzingen voor de functie van cellen die uit de thymus afkomstig zijn, werden langs een aantal wegen verkregen. VELDMAN (1969) scheidde het „T-cellen systeem” in het konijn in vivo van de B-cellen, d.m.v. een drie keer herhaalde bestraling, met bescherming van de thymus. Onder deze omstandigheden bleek de specifiek cellulaire reactie - bijna - normaal te verlopen terwijl de humorale reactie achterwege bleef (zie ook fig. 35). Een variant van deze methode werd beschreven door MITCHELL en MILLER (1968); in deze experimenten werd een receptor letaal bestraald en gesubstitueerd met thymocyten. MITCHISON (1971) toonde in dit systeem aan dat T-cellen

een rol spelen in de humorale reactie tegen een hapteen-carrier antigeen; met name blijken deze cellen te reageren tegen de carrier.

Een andere methode die aanwijzingen geeft over de functie van T-cellen, berust op de aanwezigheid van het theta iso-antigeen op cellen in de thymus (REIFF en ALLEN 1964) en op cellen in de periferie die waarschijnlijk uit dat orgaan afkomstig zijn (SCHLEZINGER en YRON 1969, 1970; RAFF 1969; RAFF en WORTIS 1970). Dit antigeen is tot nu toe niet op andere dan T-cellen gevonden, wel is gebleken dat het niet op alle T-cellen - meer - aantoonbaar is (MILLER en SPRENT 1971). Behandeling met een antithetaserum belemmert echter wel voor een deel de rozetvorming met schapenerythrocyten (MÖLLER en GREAVES 1970) en zou ook het vermogen tot een graft versus host reactie en tot „delayed type” huidreacties belemmeren (MÖLLER en RAFF 1970 a.).

De experimenten over de betekenis van de thymus voor de immunologische competentie hebben geleid tot de definiëring van een groep lymfoïde cellen, de T-cellen, die afkomstig zijn uit de thymus, en recirculeren over de periferie, waarbij ze zich meestal in bepaalde regionen van de lymfoïde organen bevinden, en die immunologische functies hebben die o.a. lijken te liggen binnen de specifiek cellulaire reactie.

Dezelfde experimenten vormden in feite de aanleiding tot de definiëring van nog een tweede groep cellen.

B-cellen

Neonatale thymectomie, of thymectomie gecombineerd met bestraling, leidde niet tot een volledige depletie van het lymfoïde systeem. WAKSMAN c.s. (1962) beschreven het persisteren van follikelcentra en van grote aantallen plasmacellen in de neonataal gethymectomeerde rat. De groep van Miller toonde aan, dat de voorlopers van cellen die in staat zijn tot IgM-productie tegen schapenerythrocyten in de muis, uiteindelijk uit het beenmerg afkomstig zijn: wanneer een letaal bestraalde muis werd gesubstitueerd met T-cellen en met beenmerg van een allogene donor, bleek uit het effect van een anti-H₂ serum, dat de antilichaamvormende cellen afkomstig waren van de beenmerg donor. Ook een chromosoom analyse van deze antilichaamvormende

cellen leidde tot deze konklusie (MILLER en MITCHELL 1968, MITCHELL en MILLER 1968; NOSSAL c.s. 1968).

Toch bleken cellen uit het beenmerg geen aantoonbaar contact te maken met een hoog specifiek gemerkt antigeen (BASTEN c.s. 1971). Ook andere waarnemingen wijzen erop dat het niet het beenmerg is dat de direkte voorlopers van IgM producerende cellen levert. COOPER c.s. (1966) toonde aan dat de lymfoïde structuren langs het maagdarmkanaal van het konijn een belangrijke rol spelen bij het herstel van het vermogen tot antilichaamvorming na een bestraling. NIEUWENHUIS (1971) vond, dat niet de aanwezigheid van deze structuren als zodanig, maar het bestaan van reactieve follikelcentra daarin beslissend was voor het herstel van zowel het parafolliculaire-cel-systeem, als van het antilichaam-vormend vermogen. Daar ook follikelcentrumreacties in andere organen voorlopers voor de IgM produktie bleken te produceren, mag worden aangenomen dat die produktie een algemene eigenschap is van reactieve follikelcentra. In dezelfde reeks experimenten werd aannemelijk gemaakt dat cellen uit het beenmerg noodzakelijk zijn voor het tot stand komen van een follikelcentrumreactie. Gecombineerd met de waarneming van Miller (zie boven) dat voorlopers van IgM producerende cellen uit het beenmerg afkomstig zijn, lijkt dit te betekenen, dat een in het beenmerg gevormde cel via een follikelcentrumreactie deel gaat uitmaken van het parafolliculaire cellensysteem, waartoe de follikel lymfocyten en de cellen in de follikelrandzone behoren. Deze cellen zijn bij het konijn in staat tot de vorming van IgM antilichamen tegen paratyfus H-antigeen (KEUNING en VAN DEN BROEK 1968) (zie ook fig. 2).

In de reeds vermelde experimenten van VELDMAN (1970) bleken T-cellen in staat te zijn tot een specifiek cellulaire reactie. Het lijkt daarom van een aantrekkelijke eenvoud, om het immunologische apparaat te verdelen in een T- en in een B-cellen systeem, die elk hun eigen functies hebben, resp. binnen de specifiek cellulaire en de humorale reactie. Dit is echter een simplifikatie die aan een aantal feiten voorbij gaat.

Gethymectomeerde, drie keer bestraalde konijnen waren in staat tot een normale IgM produktie tegen paratyfus H-antigeen, maar vormden in deze situatie geen IgG antilichamen (fig. 2), wat normale

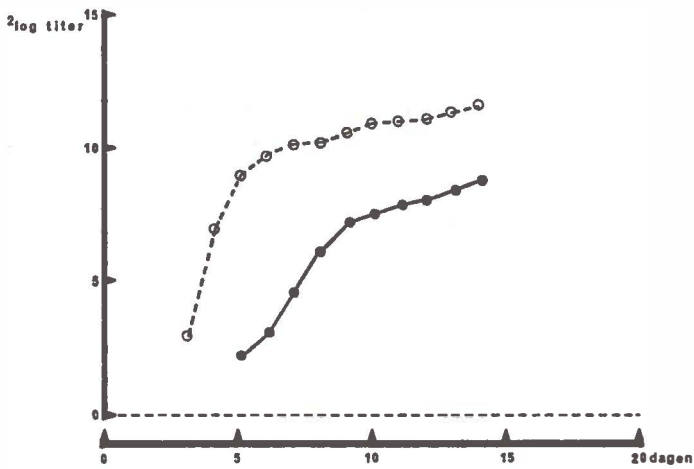


Fig. 1. Titerverloop na toediening van paratyfus-H-vaccin ($5 \cdot 10^8$ micro-organismen i.v.). Gemiddelde van 6 dieren. De gestippelde lijn geeft in deze en alle volgende figuren het verloop van de totale titer weer. De getrokken lijn geeft weer het titerverloop van de mercapto-ethanol resistente antilichamen.

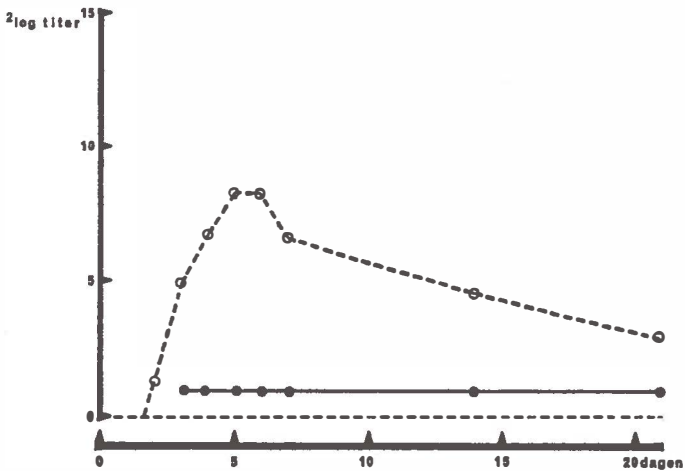


Fig. 2. Titerverloop na toediening van paratyfus-H-vaccin ($5 \cdot 10^8$ micro-organismen i.v.) aan 6 gethymectomeerde drie keer bestraalde dieren. (Keuning en v. d. Broek)

dieren wel doen (fig. 1). De interpretatie van deze waarneming is niet zonder meer evident. Het is mogelijk of zelfs waarschijnlijk dat het ontbreken van een T-cel een rol speelt bij het onvermogen tot IgG productie, daar ook in andere experimenten, bijv. na neonatale thymectomie, een belemmering werd gevonden van het vermogen tot antilichaamsynthese (MILLER 1962 a.b. 1963). Aan de andere kant is het niet duidelijk of de voorloper van de IgG vormende cel na een herhaalde subletale bestraling nog wel aanwezig is. In de genoemde experimenten van MILLER en MITCHELL (1968) werd niet onderzocht of letaal bestraalde muizen na substitutie met thymus- en beenmergcellen tot IgG productie in staat zijn. HANAOKA c.s. (1970) vonden na een bestraling (900 rad) van het konijn geen duidelijk effect van appendixbescherming op het vermogen om IgG te produceren. Een zelfde waarneming was al eerder gedaan door ROBBINS en SMITH (1963). JACOBSON c.s. (1970) toonden aan dat IgG producerende cellen in muizen die na thymectomie en letale bestraling thymocyten en beenmergcellen ontvingen, afkomstig waren uit het beenmerg. In deze experimenten werd echter 1-3 weken gewacht tussen de transfer van beenmergcellen en de - herhaalde - antigeentoedieningen. Het is dus moeilijk om uit deze experimenten herkomst en karakter van de IgG producerende cel af te leiden.

De suggestie die uitging van experimenten met T-celloze dieren, dat T-cellen van betekenis zijn voor de antilichaamvorming, kon worden bevestigd door Claman en door Miller. Letaal bestraalde muizen produceerden tegen schapenerythrocyten veel meer antilichaam, wanneer ze zowel met thymus- als beenmergcellen werden gesubstitueerd, dan wanneer ze met elk der celtgroepen alleen werden gesubstitueerd (CLAMAN c.s. 1966 a.b.). Deze waarneming werd bevestigd door MILLER en MITCHELL (1968), die tevens aantoonde, dat het beenmerg de voorloper van de IgM vormende cellen leverde. Sindsdien is een groot aantal gevallen bekend geworden van kooperatie tussen T- en B-cellen in de humorale reactie (zie ROITT c.s. 1969 en MITCHISON 1970). Hiertoe behoort ook de reactie tegen carrierhapteen antigeen. Karakteristiek voor een dergelijk antigeen is, dat een secundaire reactie tegen het hapteen alleen is op te wekken met het hapteen gekoppeld aan dezelfde carrier die in de primaire reactie werd gebruikt. RAJEWSKY c.s. (1967, 1969) maakten aannemelijk dat

bij deze reactie twee determinanten op twee verschillende cellen betrokken waren. MITCHISON (1971) toonde aan dat de cel die in deze reactie de carrier-specificiteit bezit, een T-cel is: o. a. bleek immunisatie met de carrier mogelijk in een letaal bestraalde, met thymocyten gesubstitueerde muis.

Koöperatie tussen verschillende celsoorten in de humorale reactie is reeds eerder beschreven, (FISHMAN 1959, 1961; FISHMAN en ADLER 1963; PRIBNOV en SILVERMAN 1967; GALLILY en FELDMAN 1967; FELDMAN en GALLILY 1968), doch het unieke in de interactie tussen T- en B-cellen is, dat in beide celtypen specificiteit voor het antigeen aantoonbaar is. Wat de T-cellen betreft is dit op een aantal manieren aangetoond: na incubatie met een hoog specifiek gelabeld antigeen verloren T-cellen het vermogen tot interactie met B-cellen (BASTEN c.s. 1971). Ductus thoracicuscellen uit een dier dat tolerant is voor een antigeen stelden een T-celloze receptor niet in staat op dat antigeen te reageren (MILLER 1971). Tenslotte wijst ook het eerder omschreven carrier-effekt op het bestaan van specificiteit in de T-cel populatie.

Wat de immunocompetente B-cellen betreft is deze specificiteit iets minder evident. Een radioactief gemerkt antigeen maakt beenmergcellen niet inactief. Miltcellen uit een T-celloos dier verliezen echter na incubatie met kippengammaglobuline, dat gelabeld is met I^{125} , wel het vermogen tot interactie met T-cellen (BASTEN c.s. 1971).

In de bovengenoemde experimenten werd als maatstaf voor "specificiteit" gebruikt het vermogen om met één bepaald antigeen te reageren. Daarbij zijn dus twee functies in het spel: De ene is de predestinatie van de cel; dit is waarschijnlijk een functie van het genoom van de cel. Daarbij zijn in principe twee situaties voorstelbaar: ofwel alle specificiteiten zijn in het genoom vertegenwoordigd en er wordt één geëffektueerd, ofwel de cel heeft een genetische monospecificiteit. De eerste mogelijkheid zou betekenen dat er een overdracht van alle specificiteiten plaats vindt via de kiemlijn. De tweede mogelijkheid zou berusten op somatische mutatie, optredend tijdens de proliferatie door histo-incompatibiliteit, zoals voorgesteld door JERNE (1971), of op translokatie en rekombinatie zoals voorgesteld door GALLY en EDELMAN (1970).

De tweede functie die in het spel is bij het reageren op een antigeen, is de expressie van de specificiteit - waarschijnlijk in de vorm van een

receptor - zodat het antigeen kan worden gebonden. Deze faktor, en de derde die immunocompetentie completeert, nl. het effectormechanisme van de cel, zijn toegankelijk voor experimenteel onderzoek.

De voorouders in het beenmerg van T- en B-cellen maken geen aantoonbaar contact met een radioactief antigeen. Waarschijnlijk vindt de expressie van de specificiteit wat de T-cel betreft plaats in de thymus: thymocyten werden namelijk wel gedood door dat antigeen. Ook de derde functie, het reaktiemechanisme, is althans in een aantal thymocyten aanwezig; dat geldt bijvoorbeeld voor de „helper-cel functie” in de koöperatie met B-cellen. Merkwaardigerwijs zou één immunologische reactie, nl. tolerantie wel in beenmergcellen te induceren zijn (CHILLER c.s. 1970). Tot andere reacties zijn deze cellen waarschijnlijk nog niet in staat.

In de voorgaande bladzijden werd een beschrijving gegeven van de oorsprong en de eigenschappen van twee celtypen die samenwerken in een aantal immuun-reacties. Op een aantal van deze reacties zullen we thans verder ingaan.

IMMUNOLOGISCHE REAKTIES

Primaire reactie

Een effectief contact tussen een antigeen en het lymfoïde systeem leidt, wat de meeste antigenen betreft, tot een kompleks van morfologische en funktionele reacties. Daartoe behoort o.a. de proliferatieve reactie in de thymus-afhankelijke gebieden, die uiteindelijk leidt tot vorming van kleine lymfocyten, die o.a. als “killer cells” verantwoordelijk zijn voor de transplantatuitstoting. Of voor deze „specifiek cellulaire reactie” koöperatie tussen lymfoïde cellen nodig is, is niet bekend. BARCHILON en GERSHON (1970) vonden een toename van de „graft versus host” aktiviteit van thymocyten, wanneer een combinatie van deze cellen en perifere bloedcellen werd gebruikt. CANTOR c.s. (1970) en CANTOR en ASOFKY (1970) beschreven interactie tussen miltcellen onderling en tussen thymus- en milt- of lymfkliercellen. Waarschijnlijk is een van de betrokken cellen dus een T-cel, het karakter van de andere cel is niet duidelijk. De mogelijkheid bestaat dat het een B-cel is; in een aantal situaties speelt echter waarschijnlijk ook een mononucleaire-macrophage een rol. (LUBAROFF en WAKSMAN 1968 a.b.).

Parallel aan de specifiek cellulaire reactie, en blijkbaar in een aantal gevallen daarvan afhankelijk, verloopt de humorale immuunreactie. Deze omvat de antilichaamproductie en de „memory vorming” en wordt morfologisch gekarakteriseerd door de plasmacellulaire reactie en de follikelcentrum-reactie. De plasmacellulaire reactie omvat de - de novo - vorming van plasmacellen en hun proliferatie (FAGREUS 1948). Variërend met de „thymusafhankelijkheid” van het antilichaam, lijkt de inductie van deze reactie zich in de lymfklier meer naar perifeer (buitenste corticale gebied) of meer naar centraal (overgang cortex paracortex) af te spelen (zie VELDMAN 1970).

De plasmacellulaire reactie gaat gepaard met het verschijnen van antilichamen in de circulatie. De antilichaamvorming tegen bijvoorbeeld paratyfus H-antigeen (fig. 1) verloopt in een aantal fasen. Na een latente fase van ± 48 uur volgt een exponentiële stijging van de IgM titer, die waarschijnlijk zowel berust op een vermenigvuldiging van IgM vormende plasmacellen, als op een toename van de productiecapaciteit van die cellen (KEUNING c.s. 1967). De IgM productie bereikt een hoogtepunt omstreeks de 6e dag, en lijkt daarna abrupt te stoppen. Vanaf \pm de 4e dag is de productie van mercapto-ethanol-resistente antilichamen (verder IgG genoemd) waarneembaar. Na een snelle stijging tot \pm de 8e dag (eerste fase van de IgG synthese) vindt nog een langzame verdere toename van de titer plaats (tweede fase van de IgG synthese). De aanwijzingen over de rol van T- en B-cellen in dit deel van de reactie zijn besproken op blz. 7.

Een derde onderdeel van de primaire reactie bestaat uit de memory-vorming tegen een bepaald antigeen; dit omvat de veranderingen in het lymfoïde systeem, die ertoe leiden dat een volgend contact met het antigeen op karakteristieke wijze, de secundaire reactie, beantwoord wordt. Deze veranderingen spelen zich af in cellen, en wel in lymfocyten. GOWANS en UHR (1966) toonden nl. aan dat „memory” over te dragen is d.m.v. ductus thoraciscellen; overdracht met serum van een geïmmuniseerd dier is niet effectief (zie o.a. fig. 35). Aangezien de ductus thoraciscellen dit vermogen behielden na een kweekperiode tijdens welke vrijwel alle grote en

middelgrote lymfoïde cellen doodgingen, lijkt het waarschijnlijk dat het hier gaat om kleine lymfocyten. Tot dezelfde conclusie kwamen BOSMAN en FELDMAN (1968) na een gecombineerd elektronenmicroscopisch en auto- radiografisch onderzoek.

Een van de meest kenmerkende verschijnselen in de secundaire reactie is het grote aantal cellen dat daarbij betrokken is. Waarschijnlijk omvat het proces van memory-vorming dus een proliferatie van cellen. Experimenten die ten doel hadden deze proliferatie te belemmeren hebben inzicht gegeven in het verloop van dat proces. NOSSAL en MÄKELÄ (1962) meenden dat memorycellen vlak voor de tweede antigeentoediening - nog - prolifererden. Labeling met ^3H -thymidine in een geïmmuniseerd dier vlak voor een tweede antigeentoediening leidde in hun experimenten namelijk tot gelabelde plasmacellen. In andere experimenten (COHEN en TALMAGE 1965) bleken deze waarnemingen echter niet reproduceerbaar; waarschijnlijk speelde reutilisatie van de label in de experimenten van Nossal een rol. Langs andere wegen kon echter de betekenis van proliferatie aannemelijk worden gemaakt. Wanneer als parameter voor de gevormde memory de piektiter in de secundaire reactie werd gebruikt, bleek deze memory in kwantitatief opzicht afhankelijk te zijn van het tijdsinterval tussen eerste en tweede antigeentoediening (SCHÜTZE 1941, STAVITSKY 1954, IPSEN 1959 en THORBECKE c.s. 1962). Een interval van 5—6 weken resulteerde in een maximale memoryproductie. Na de 6e week nam de produktie nog maar zeer weinig toe.

De snelle toename van memory in de eerste weken van de primaire reactie zou verklaard kunnen worden uit een sterke celproliferatie in die periode. Voor deze verklaring pleit het effect van ioniserende stralen en een aantal farmaka toegediend in die periode. Röntgenbestraling kort voor de eerste antigeentoediening voorkwam de vorming van memory geheel (STEVENS 1953, WHITE 1955). Bestraling in de eerste dagen van de primaire reactie interfereerde met de memory-vorming, doch dit effect bleek reversibel te zijn; wanneer langer gewacht werd alvorens het tweede antigeen toe te dienen ontstond weer een normale secundaire reactie. Wanneer langer na de primaire immunisatie (± 3 weken) werd bestraald trad geen herstel meer op (PORTER 1960, 1964; THORBECKE c.s. 1967;

NETTESHEIM c.s. 1967). Bestraling vlak voor de tweede antigeen-toediening tenslotte, bleek de secundaire reactie geheel onmogelijk te kunnen maken. (STONER en HALE 1962). De radiogevoeligheid van de memorycel bleek even groot te zijn als die van de virginale immunocompetente cel. In die gevallen waarin de secundaire reactie na een bestraling wel waarneembaar was, kon dit worden verklaard uit het grotere aantal cellen dat bij de secundaire reactie betrokken was (MAKINODAN c.s. 1962).

Ongeveer dezelfde effecten op de memory-vorming werden bereikt met een zeer uitgebreide skala van farmaka (HURLIMANN c.s. 1967, BUTLER en COONS 1964). Meestal bleek ook hier een maximale suppressie van de memory-vorming te kunnen worden verkregen door toediening in de eerste fase van de primaire reactie. In de grote reeks stoffen die gebruikt werden door laatstgenoemde onderzoekers, valt het geringe effect van hydrocortison op.

Wanneer men aanneemt dat de effecten zowel van bestraling als van de gebruikte farmaka voor een belangrijk deel veroorzaakt worden door een proliferatie-belemmering, dan lijken de genoemde waarnemingen erop te wijzen dat memoryproductie in twee fasen verloopt: een zeer snelle, gevolgd door een langzame verdere proliferatie. Het is niet duidelijk of beide processen zich in één en dezelfde celgroep afspelen. Waarnemingen van Celada (1967) zouden kunnen wijzen op het bestaan van 2 groepen memorycellen voor de IgG produktie in muizen; uit de afname van het reactievermogen van cellen die uit een geïmmuniseerde donor werden overgebracht naar een bestraalde receptor, berekende hij, dat er behalve cellen met een levensduur van ± 26 dagen, cellen met een levensduur van 190 dagen aanwezig zijn.

Het morfologisch substraat van de memory-vorming is niet met zekerheid bekend. Thorbecke legde verband tussen de follikelcentrumreactie en de vorming van memory. In een aantal experimenten werden hiervoor indirecte aanwijzingen gevonden:

- a. Gelijktijdige toediening van een antigeen en endotoxine leidde tot een stimulering zowel van de memory-vorming, als van de follikelcentrumreactie. Wanneer 7 dagen na de eerste antigeen-toediening opnieuw werd gestimuleerd, bleken de eerste anti-lichaamvormende cellen waarneembaar in het gebied van de

witte pulpa van de milt, een gebied dat door de wijze van immunisatie grotendeels uit reactieve follikelcentra bestond (THORBECKE c.s. 1962).

- b. De schade die werd toegebracht aan de memoryproductie door een bestraling in het begin van de primaire reactie, was gekorreleerd met de verstoring van de follikelcentrum-activiteit. Bestraling in de periode dat follikelcentra actief waren (8 dagen na antigeentoediening), werd gevolgd door een snel herstel zowel van de follikelcentrum-activiteit als van het vermogen om te reageren met een secundaire reactie (THORBECKE c.s. 1964). In niet gepubliceerde experimenten in dit laboratorium bleek deze korrelatie wel te bestaan t.a.v. de IgG memoryvorming maar ook in afwezigheid van een follikelcentrum-reactie bleek toch IgM memoryvorming op te treden (HOEKSTRA c.s. 1967).
- c. Een secundaire reactie kon zowel in vivo als in vitro worden opgewekt in cellen die afkomstig waren uit een geïmmuniseerde donor. Een maximale reactie kon worden verkregen met cellen uit de reactieve witte pulpa van de milt (WAKEFIELD en THORBECKE 1968, COHEN c.s. 1966, JACOBSON en THORBECKE 1968).
- d. Tenslotte ontstonden in dieren die tolerant waren voor een bepaald antigeen, en daartegen dus wellicht ook geen memory produceerden, geen follikelcentrum-reacties (COHEN c.s. 1964).

De hypothese dat in het reactieve follikelcentrum immunocompetente cellen worden geproduceerd, werd bevestigd door labeling van cellen uit de witte pulpa op het hoogtepunt van de follikelcentrumreactie. Uit deze cellen bleken kleine lymfocyten te ontstaan. De specificiteit van deze, uit het reactieve follikelcentrum genomen, cellen bleek beperkt tot die van het antigeen dat die reactie had geïnduceerd. Stimulering van die cellen met niet kruis-reagerende antigenen leidde namelijk niet tot antilichaamproductie of celproliferatie (WAKEFIELD c.s. 1967, WAKEFIELD en THORBECKE 1968 a.b.).

De koöperatie tussen de T- en B-cellen bij de antilichaamvorming maakt ten aanzien van de memoryvorming twee vragen relevant: In de eerste plaats is dat de vraag in welke van die twee celtypen memory wordt opgebouwd, in de tweede plaats of voor die opbouw koöperatie van cellen nodig is. Logischerwijs volgt hierop meteen de vraag of voor de secundaire reactie celkoöperatie nodig is (zie blz. 70).

Uit de experimenten van Gowans bleek, dat de memorycel in de rat voorkomt in de ductus thoracicus-populatie; verder bleek deze cel een voorouder te zijn van een antilichaamvormende cel (GOWANS en UHR 1966, ELLIS c.s. 1969). In de experimenten van Thorbecke (zie boven) werd de memorycel geïdentificeerd als een cel uit de follikelcentrumreactie. Daar deze laatste reactie ook in neonataal gethymectomeerde dieren voorkomt (WAKSMAN c.s. 1962, VELDMAN 1970) lijken beide waarnemingen te wijzen in de richting van een memory B-cel. Daarbij wordt gepostuleerd dat een T-cel ook na een herhaalde antigeentoediening niet tot antilichaamproductie in staat is, en dat er geen T-cellen aan de normale follikelcentrumreactie deelnemen.

Een aantal experimenten geeft directe aanwijzingen over het bestaan van een T-cel memory. Na behandeling van miltcellen uit een immuun dier met een anti-theta serum, bleken deze cellen niet meer in staat tot een secundaire reactie. Toevoeging van virginale T-cellen herstelde dit vermogen niet (TAKAHASHI c.s. 1970). CUNNINGHAM (1969) vond een synergisme tussen miltcellen uit een geïmmuniseerde donor en virginale beenmergcellen, die tezamen werden overgebracht naar een bestraalde receptor. Onder die omstandigheden bleken antilichaamvormende cellen afkomstig te zijn uit de beenmergdonor. Men zou uit die waarneming kunnen afleiden dat een (T-?) memorycel een virginale B-cel tot een secundaire reactie kan bewegen. In een vergelijkbare proefopstelling vond JACOBSON echter geen aandeel van de beenmergdonor in de antilichaamproductie (JACOBSON c.s. 1970). Uit waarnemingen van MILLER bleek dat T-cellen een rol spelen in de secundaire reactie, maar in deze experimenten kon die rol worden overgenomen door - een groot aantal - virginale T-cellen (MILLER en SPRENT 1971).

Samenvattend kan men stellen dat er zowel aanwijzingen zijn voor een T-cel memory als voor een B-cel memory, maar dat geen van beide overtuigend zijn aangetoond.

De tweede vraag die de kooperatie van T- en B-cellen opriep, was het probleem of voor de *memoryvorming*, in welke celgroep dan ook, kooperatie nodig is. Wat de B-cellen betreft zouden experimenten in T-celloze dieren hierop een antwoord kunnen geven: In neonataal gethymectomeerde dieren vonden een aantal onderzoekers

een normale memoryvorming (FICHTELIUS en LAURELL 1961, SVET-MOLDAWSKY c.s. 1964, SINCLAIR 1967), blijkend uit een normale secundaire reactie na een tweede antigeentoediening. In andere experimenten bleek de memoryvorming onder deze omstandigheden sterk gestoord te zijn (HESS c.s. 1963). Bij deze waarnemingen moet worden bedacht dat na neonatale thymectomie een spontaan herstel kan optreden van het vermogen tot antilichaamvorming (zie SINCLAIR 1967). Na thymectomie op volwassen leeftijd, gevolgd door een anti-lymfocyten-serum behandeling, vonden LEUCHARS c.s. (1968) een normale secundaire reactie, wijzend op een normale memoryproductie onder deze omstandigheden.

In een aantal gevallen lijkt dus memoryvorming, waarschijnlijk in de B-cel populatie, op te treden zonder dat koöperatie met T-cellen mogelijk is. Ook wat de memoryvorming in T-cellen betreft, wijzen de eerder genoemde experimenten van MITCHISON (1971 a, b, c) er op, dat immunisatie met een carrier-antigeen effectief kan zijn in een letaal bestraalde, met thymocyten gesubstitueerde muis. Ook hier lijkt koöperatie niet noodzakelijk voor de vorming van memory.

Secundaire reactie

Karakteristiek voor de morfologie van het lymfoïde apparaat na een herhaalde antigeen toediening is het grote aantal plasmacellen (LEDUC c.s. 1955, v. BUCHEM c.s. 1962). VAN BUCHEM vond de eerste elementen van de plasmacellulaire reeks reeds 24 uur na de tweede antigeentoediening. In deze experimenten leek de inductie van de secundaire reactie, zowel tegen paratyfus H-antigeen als tegen paardengammaglobuline, plaats te vinden medullair-waarts van de follikels (v. BUCHEM 1962).

Het grote aantal plasmacellen zou het gevolg kunnen zijn, ofwel van een snelle plasmacel polifерatie, ofwel van een zeer groot aantal geïnduceerde cellen. De verdubbelingstijd van het aantal antilichaamvormende cellen in de secundaire reactie bedraagt voor de IgM producerende cellen in het begin van de reactie 4-6 uur (SADO c.s. 1970, TANNENBERG en MALAVTYA 1968). Van de 4e-6e dag bedraagt ze ± 22 uur (SADO c.s. 1970). De IgG producerende celgroep verdubbelt in ± 7 uur vóór en ± 48 uur ná de 4e dag (SADO c.s. 1970). Voor

de IgM producerende cellen in de secundaire reactie berekenden TANNENBERG en MALAVIYA een generatietijd van ± 13 uur; MAKINODAN bepaalde deze waarde op ± 4 uur voor de IgM producerende cellen en op ± 8 uur voor de IgG producerende cellen (SADO c.s. 1970). De grote meerderheid van de cellen produceert op elk ogenblik van de secundaire reactie IgG. Wanneer men aanneemt dat de generatietijd van de meerderheid der plasmacellen derhalve 8 uur of langer is, lijkt het onwaarschijnlijk dat de grote toename van het aantal plasmacellen in de secundaire reactie ten opzichte van de primaire reactie een gevolg is van een veel snellere plasmacel-proliferatie. Ook in de primaire reactie is de generatietijd van de meerderheid der cellen namelijk bepaald op ± 8 uur of langer (JERNE c.s. 1963, TANNENBERG en MALAVIYA 1968). Men moet derhalve aannemen, dat het grote aantal antilichaamvormende cellen in de secundaire reactie het gevolg is van de inductie van een groot aantal memorycellen.

De snelheid van de uitbreiding van de groep plasmacellen komt het meest overeen met een model waarin deze inductie over een lange periode verspreid plaats vindt (zie MAKINODAN c.s. 1969, SADO c.s. 1970).

Het gevolg van al deze gebeurtenissen is een snelle stijging van de titer aan circulerende antilichamen, meestal tot een hoge maximale waarde. Dit aspect van de secundaire reactie werd in een indrukwekkende studie kwantitatief geanalyseerd door GLENNY en SÜDMERSEN (1921). Zij beschreven, dat na een tweede toediening van tetanustoxoid een snel beginnende stijging van de immuniteit tot een hoge, langdurig aanhoudende waarde plaats vond.

Behalve deze kwantitatieve, zijn er ook kwalitatieve verschillen tussen de antilichamen, geproduceerd in de primaire en in de secundaire reactie. In een aantal gevallen werd in de secundaire reactie nl. geen produktie van IgM antilichamen gevonden (UHR 1964, UHR en FINKELSTEIN 1963, FINKELSTEIN en UHR 1964). In situaties waarin dat wel het geval was, bleek toch het aantal IgG producerende cellen sterk te overheersen. MAKINODAN vond 10-40 keer zoveel IgG producerende cellen in de secundaire reactie tegen schapenerythrocyten (SADO c.s. 1970). Ook de kwaliteit van de binding tussen antigeen en antilichaam is in de secundaire reactie anders dan in de primaire. STEINER en EISEN (1967) vonden reeds de eerste dag van

de secundaire reactie een hoge waarde voor de evenwichtsconstante van de hapteen - antihapteen reactie. Deze hoge affiniteit per determinant leidt bij macromoleculaire antigenen tot een sterke neiging tot de vorming van complexen (hoge aviditeit). In de primaire reactie daarentegen zijn deze waarden aanvankelijk laag, en stijgen meestal in het verloop van de reactie (EISEN en SISKIND 1964). Tenslotte daalt het onderscheidingsvermogen van antilichamen in de secundaire reactie; er is een toenemende neiging om met verwante antigenen te reageren (LITTLE en EISEN 1969).

Welke rol speelt nu de celkoöperatie bij de secundaire reactie? De waarnemingen over memoryvorming en expressie in „T-celloze dieren” (zie blz. 15) suggereren dat een T-cel geen rol speelt bij de secundaire reactie. Behandeling met een anti-theta serum deed echter het secundaire-reactievermogen dalen (RAFF 1970, zie ook blz. 14). Het is duidelijk dat de bestaande experimentele gegevens geen konklusie toelaten over de rol van celkoöperatie bij de secundaire reactie.

Vraagstelling

In dit hoofdstuk werden aanwijzingen besproken voor het bestaan van „T”- en „B”-cellen. De rol van deze cellen bij de primaire reactie, de memoryvorming en de secundaire reactie bleek niet steeds even duidelijk te zijn. De volgende vragen leken met name - nog - niet beantwoord:

- a. wat is de rol van de T-cel in de primaire reactie, met name wat de IgG produktie in het konijn betreft;
- b. wat is de aard en de herkomst van de B-cellen die bij deze synthese betrokken zijn;
- c. welke rol speelt celkoöperatie bij de memoryvorming;
- d. in welke cellen speelt die memoryvorming zich af;
- e. welke cellen spelen een rol in de secundaire reactie.

Het zijn deze vragen die de kern van dit onderzoek vormen.

Hoofdstuk II

MATERIAAL EN METHODEN

Proefdieren

Voor de hierna beschreven experimenten werden ongeveer 4 maanden oude, manlijke Goud Agouti konijnen gebruikt. Deze dieren werden betrokken van het Centraal Proefdierenbedrijf T.N.O. (Zeist).

Antigenen

Als antigenen werden gebruikt: Een suspensie van met formaline gedode Salmonella Java bacteriën - (paratyphus-B, rijk aan H-antigeen) - bereid door dr. A. Jansz (Streeklaboratorium voor Volksgezondheid). De dosering en de wijze van toediening van dit antigeen wordt bij elk experiment aangegeven.

Als tweede antigeen werd gebruikt: Paardengammaglobuline; tenzij anders aangegeven betrof dit „Horse gammaglobulins” fract. 282-254 (Fluka A.G.). Dit antigeen werd toegediend in een dosering van 5 mg. opgelost in 1 ml. fysiologisch zout; ook van dit antigeen wordt de wijze van toediening bij elk experiment beschreven.

Hyperimmuun sera

In een aantal situaties werd passief geïmmuniseerd. Hiervoor werd een antiserum gebruikt dat werd verkregen door herhaalde injecties van Salmonella paratyfus-B H-vaccin ($5 \cdot 10^8$ micro-organismen) met een interval van 4 weken. 0,1 ml. van dit antiserum, intraveneus toegediend, leidde tot een passieve titer van ± 2 .

Bestralingen

De bestralingen werden uitgevoerd op de afdeling Radiopathologie

met een Philips-Müller (M.G. 300) apparaat, funktionerend op 200 K.V. en 15 m.A. De gebruikte filters waren 0,5 mm Cu en 0,6 mm Al. De resulterende straling had een halveringslaag van $\pm 1,0$ mm Cu.

Totale lichaamsbestraling werd uitgevoerd door de dieren achter-eenvolgens op de linker- en de rechter kant te bestralen, zodat een homogene dosis van ± 450 rad werd bereikt.

Totale lichaamsbestraling met bescherming van de thymus werd uitgevoerd overeenkomstig de beschrijving van VELDMAN (1970).

Bescherming van de appendix werd uitgevoerd zoals beschreven door NIEUWENHUIS (1971).

Lokale bestraling van de milt werd uitgevoerd na voorafgaande fixatie van dat orgaan aan de buikwand, overeenkomstig de beschrijving van Bos (1967).

Bepaling van antilichaamtiter in het bloed

Voor de bepaling van paratyfus-antilichamen werden sera in een halveringsreeks verdund en hieraan werd een standaardhoeveelheid antigeen (Fickers suspensie) toegevoegd (zie o.a. KEUNING c.s. 1963).

Voor de bepaling van paardengammaglobuline-antilichamen werd gebruik gemaakt van de passieve haemagglutinatie-techniek volgens BOYDEN (1951) gemodificeerd door STAVITSKY (1954, 1964). Verse humane O erythrocyten werden getanneerd, met paardengammaglobuline gesensibiliseerd en gevoegd bij gedecomplementeerd serum, dat in een halveringsreeks was verdund. Deze methode werd uitgevoerd volgens de beschrijving van SNIJDERS (1969).

STAVITSKY beschreef in 1969 een methode om erythrocyten met glutaar-aldehyde te fixeren en vervolgens te sensibiliseren (BING c.s. 1969). Wij zijn er niet in geslaagd deze methode te reproduceren. Fixatie met een geringe hoeveelheid glutaar-aldehyde was zeer effectief (erythrocyten bleken gedurende ± 1 jaar houdbaar te blijven) maar een reproduceerbare sensibilisatie van deze cellen bleek niet mogelijk, noch spontaan, noch m.b.v. tannine, noch m.b.v. Bis-diazo-benzidine reagens.

Scheiding van IgM en IgG antilichamen

Sera werden gedurende 24 uur bij 4° C geïncubeerd met gelijk volume mercapto ethanol (0,2 M). Daarna werd op dezelfde wijze als boven beschreven de antilichaamtiter bepaald.

Celtransfer

Celsuspensies werden bereid volgens de methode beschreven door VELDMAN (1970). Voor de i.v. injectie van deze suspensie werd het aantal levende cellen bepaald, door een monster te incuberen met 0,1 % eosine in fysiologisch zout, en vervolgens het aantal ongekleurde cellen te tellen.

Chirurgie

Thymectomie en appendixchirurgie werden uitvoerig beschreven door NIEUWENHUIS (1971). De hier gevolgde methode is in essentie dezelfde.

Miltchirurgie (miltfixatie en splenectomie) werd uitgevoerd overeenkomstig de beschrijving van Bos (1967).

Hoofdstuk III

IGG SYNTHESE IN DE PRIMAIRE REAKTIE

Het uitgangspunt voor de in dit hoofdstuk te beschrijven experimenten vormde de waarneming dat konijnen, waarin het systeem van - thymus afkomstige - T-cellen was geëlimineerd, op toediening van paratyfusvaccin reageerden met de produktie van antilichamen, waarin de IgG klasse ontbrak (zie fig. 2) (KEUNING en v. D. BROEK 1968). In deze dieren was de eliminatie van T-cellen bereikt door thymectomie op volwassen leeftijd, gevolgd door een drie keer herhaalde, subletale, totale lichaamsbestraling. De vraag die deze waarneming oproept is nu, of de stoornis in de IgG synthese werd veroorzaakt door het ontbreken van T-cellen, of door een onbedoelde „bijwerking” van de bestraling.

Het antwoord op die vraag zou zonder veel moeite gegeven kunnen worden, wanneer het mogelijk zou zijn het B-cellen systeem - dwz. de populatie van de plasmacel voorlopers - functioneel te „isoleren”, zonder daarbij gebruik te maken van bestraling. In een aantal proefdiersoorten is dat mogelijk door thymectomie te verrichten kort na de geboorte; in konijnen leidt een dergelijke neonatale thymectomie echter niet tot een duidelijke stoornis in de immunologische competentie op volwassen leeftijd (ARCHER c.s. 1961, 1962, 1963). Een ander methode om T-cellen te elimineren, zonder van bestraling gebruik te maken, is behandeling met anti-lymfocyten- of antithetaserum. A.L.S. werkt echter niet alleen op T-cellen, en antithetaserum doodt niet alle T-cellen (SPRENT c.s. 1971). Ook een langdurige drainage van de ductus thoracicus tenslotte, leidt niet tot een volledige depletie van de thymus afhankelijke gebieden. Deze methode is evenmin als bestraling of antiserumbehandeling specifiek en heeft daarnaast het bezwaar bij het konijn technisch moeilijk uitvoerbaar te zijn.

De combinatie van thymectomie met herhaalde bestraling lijkt dus

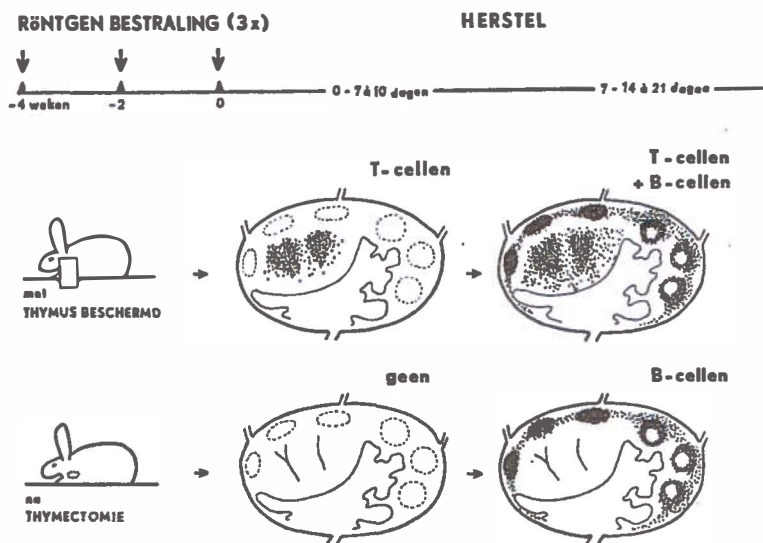


Fig. 3. Het herstel van het lymfoïde systeem na een drie keer herhaalde sublethale bestraling in een dier dat bestraald werd met bescherming van de thymus (boven) resp. bestraald werd na thymectomie (onder).

bij dit proefdier de meest bruikbare methode voor het elimineren van de T-cellen. De keuze van dit experimentele systeem houdt in, dat naast de T-celloze bestraalde dieren een controlegroep moet worden gebruikt, bestaande uit dieren die wel over T-cellen beschikken, maar die toch bestraald zijn. Voor deze controlegroep zijn dieren die, zonder gethymectomeerd te zijn, enige malen totaal worden bestraald, minder geschikt, daar het T-cellen systeem door de bestraling ernstige schade lijdt en zich maar langzaam herstelt. Een beter controlesysteem is beschreven door VELDMAN (1970). In deze experimenten werden konijnen, met een tijdsinterval van 14 dagen drie keer bestraald (450 rad), terwijl daarbij het thymusgebied werd beschermd. Deze dieren vertoonden reeds 24 uur na de laatste bestraling een aanzienlijk herstel in de thymus afhankelijke gebieden van het lymfoïde apparaat (zie fig. 3). De specifiek cellulaire reactie in deze gebieden verliep 4 dagen na de laatste bestraling weer vrijwel normaal. Dit geldt zowel wanneer de reactie wordt geïnduceerd door een homologe huidtransplantaat, dat dan ook normaal wordt uitgestoten, als na applicatie van een "chemical sensitizer". Behalve een onmiddellijk

„herstel” van het T-cellen systeem vond in deze dieren vanaf \pm de 7e dag ook weer regeneratie plaats van het para-folliculaire B-cellen-systeem. Dit manifesteerde zich door een influx van kleine lymfocyten in de follikels en het terugkeren van follikelrandcellen. Na een bestralingsprocedure waarbij de thymus wordt beschermd, vindt dus achtereenvolgens een herstel van het T-cellen systeem en van het B-cellen systeem plaats. Uiteindelijk resulteert een dier dat morfologisch weer een normaal lymfoïd apparaat heeft. De IgG productie waartoe deze dieren in staat zijn, kan dus het antwoord geven op de vraag in hoeverre het ontbreken van T-cellen verantwoordelijk is voor het uitblijven van IgG productie in de experimenten van KEUNING en v. D. BROEK (zie boven).

Experimenten

Een groep die uiteindelijk 7 proefdieren telde, werd verkregen door de dieren te thymectomeren, en ongeveer drie weken daarna totaal te bestralen met 450 rad. Met tussenpozen van 14 dagen werd deze bestraling nog twee keer herhaald. Na de laatste bestraling werd 4, 6 of 16 weken gewacht, voor de eerste antigeentoediening plaats vond (zie fig. 4).

Bestraalde dieren met T-cellen

Deze controlegroep werd verkregen door 7 dieren drie keer te bestralen met een tijdsinterval van 2 weken. Tijdens de bestraling (450 rad) werd het thymusgebied beschermd. Vijf dieren ontvingen 8 weken na de laatste bestraling antigeen, twee dieren 16 weken na de laatste bestraling.

Tijdens de boven beschreven behandelingsprocedure van de experimentele en de controlegroep, trad een ernstige complicatie op. Terwijl de operatiesterfte in de gethymectomeerde en de bestralingssterfte in de controlegroep nihil was, trad in de gethymectomeerde groep tussen de tweede en de derde bestraling een mortaliteit op van $\pm 60\%$. De overlevende dieren waren overigens in een goede gezondheidstoestand. Door hun geringe aantal was het evenwel onontkoombaar de beide antigenen die we wilden gebruiken, namelijk paratyfusvaccin en paardengammaglobuline, in één en het zelfde proefdier te testen.

Deze proefopstelling maakte het noodzakelijk na te gaan of de antilichaamproduktie tegen elk van de antigenen beïnvloed wordt door de toediening van het andere antigeen. Om deze vraag te kunnen beantwoorden werden uit een onbestraalde controlegroep drie dieren achtereenvolgens met beide antigenen geïmmuniseerd, drie dieren alleen met paratyfusvaccin, en vijf dieren alleen met paardengammaglobuline.

Immunisatie

De dieren uit de bestraalde gethymectomeerde en uit de bestraalde controlegroep ontvingen eerst paratyfusvaccin in een totale dosis van $6 \cdot 10^7$ microorganismen. Het vaccin werd verdeeld in 4 gelijke doseringen, die simultaan werden gegeven: resp. intraveneus, interscapulaire en in de linker en rechter achterpoot subcutaan; 7 dagen daarna werd paardengammaglobuline, in totaal 5 mg., opgelost in fysiologisch zout (1 ml), toegediend. Ook dit antigeen werd, verdeeld in 4 gelijke doseringen, ingespoten op dezelfde wijze als het paratyfusvaccin. De dieren uit de onbestraalde controlegroep kregen ofwel beide, ofwel een der antigenen toegediend, op een wijze als boven beschreven is.

Resultaten

Het verloop van de antilichaamtiter na opeenvolgende toediening van paratyfusvaccin en paardengammaglobuline (resp. fig. 4 en fig. 5) verschilde in normale dieren niet van het titerverloop na toediening van elk der antigenen afzonderlijk (resp. fig. 6 en fig. 7). Er werden geen aanwijzingen gevonden voor het bestaan van kruis-reaktiviteit. Een serum met hoge anti-paratyfus H titer bleek geen agglutinatie van met paardengammaglobuline gesensibiliseerde erythrocyten te geven. Ook omgekeerd gaf een positief anti-paardengammaglobulineserum geen agglutinatie met een paratyfus suspensie. Het verloop van de antilichaamvorming tegen paratyfus komt overeen met de beschrijving op blz. 10. De antilichaamvorming tegen paardengammaglobuline (fig. 7) was in normale dieren niet waarneembaar voor de 5e dag na antigeentoediening. De latentietijd van de antilichaamvorming tegen dit antigeen is dus veel langer dan de

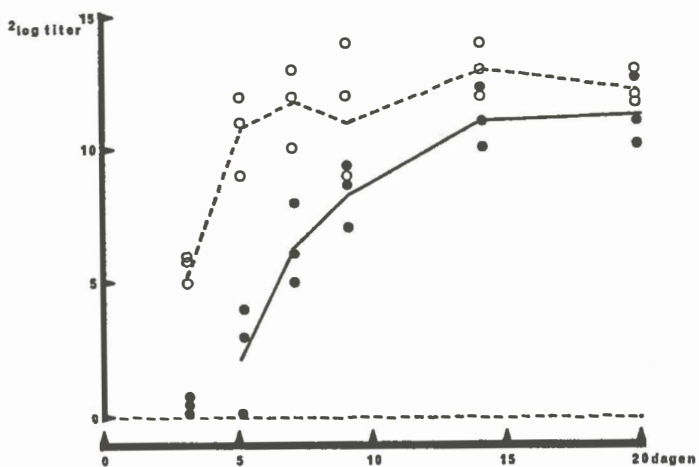


Fig. 4. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus i.v. + s.c. — 7 dagen
Pgg i.v. + s.c.

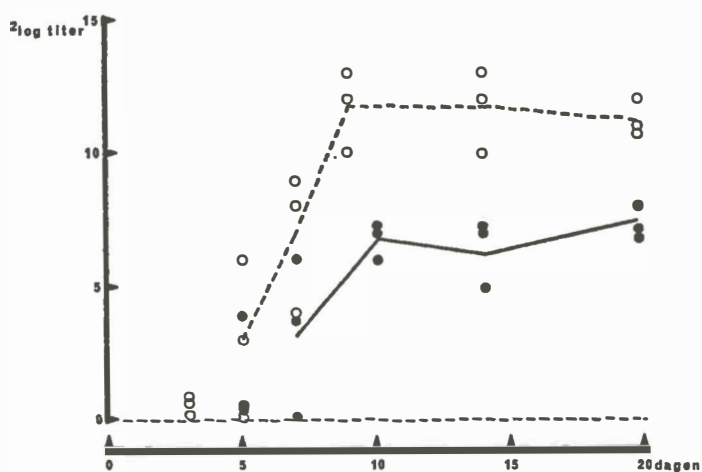


Fig. 5. Titerverloop van de anti-Pgg antilichamen na: Paratyfus i.v. + s.c. — 7
dagen Pgg i.v. + s.c.

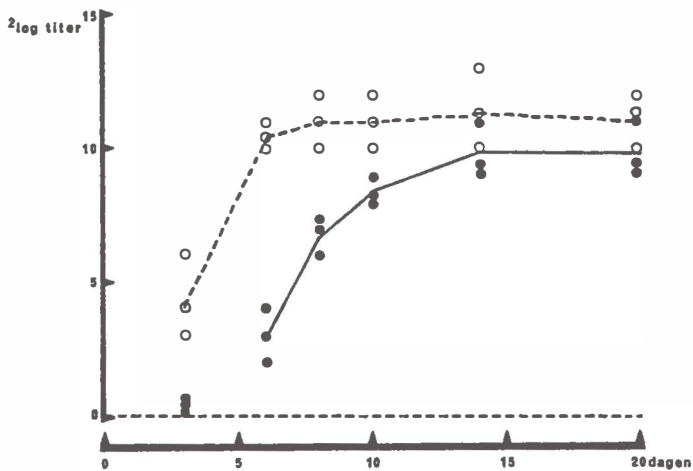


Fig. 6. Titerverloop van de H-agglutinininen na: Paratyfus i.v. + s.c.

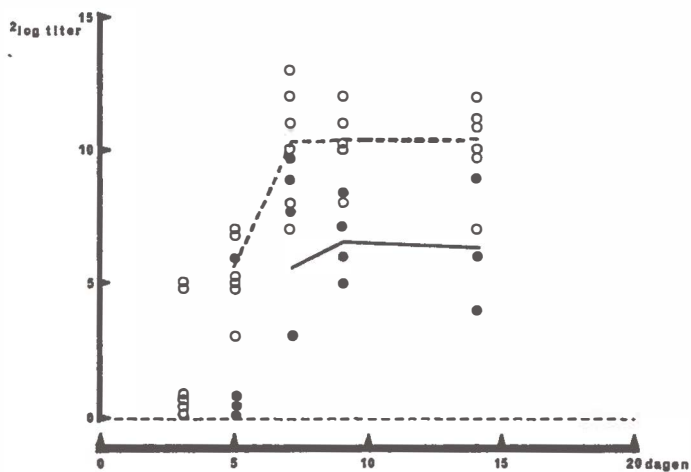


Fig. 7. Titerverloop van de anti Pgg antilichamen na: Pgg i.v. + s.c.

latentietijd van anti-paratyfus H antilichaamproduktie, die ± 2 dagen bedraagt. Een zelfde waarneming werd, eveneens bij konijnen, gedaan door v. BUCHEM (1962). Alles tezamen lijkt de conclusie gerechtvaardigd, dat de gebruikte wijze van antigeentoeediening geen onderlinge beïnvloeding van het titerverloop geeft.

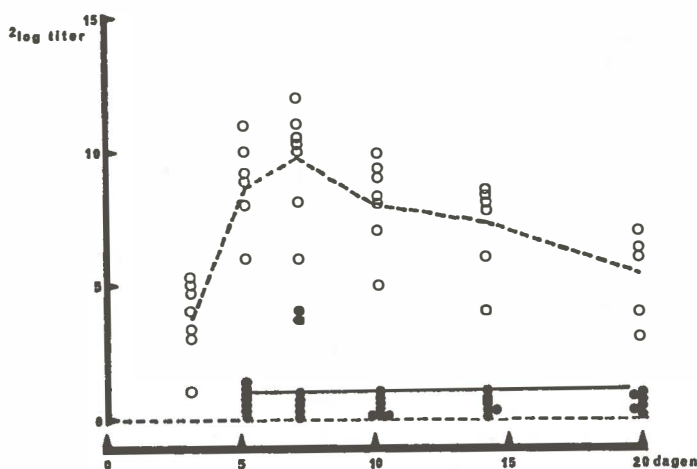


Fig. 8. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 4 tot 16 weken na de laatste van drie subletale bestralingen van gethymectomeerde dieren.

In fig. 8 is de antilichaamvorming tegen paratyfus weergegeven in een groep van 7 dieren, die na thymectomie drie keer werden bestraald en die vaccin toegediend kregen, 4, 6 of 16 weken na de laatste bestraling. Evenmin als in de experimenten van KEUNING en v. D. BROEK (1968) (zie fig. 2) werd in deze dieren IgG productie waargenomen. De IgM synthese lijkt een normaal verloop te hebben.

In de proefdieren waarvan tijdens de bestraling de thymus werd beschermd, werd naast IgM ook de vorming van antilichamen uit de IgG klasse waargenomen (fig. 9). De produktie van deze antilichamen verliep echter duidelijk anders dan in de onbestraalde dieren. Met name leek de snelle stijging tussen de 4e en 7e dag, dwz. de eerste fase van de IgG produktie, geheel te ontbreken. Wel was de tweede fase van de IgG produktie, waarin een langzame titerstijging optreedt vanaf de 8e dag, met een verdubbelingstijd van 24-48 uur, aanwezig. De twee dieren uit deze groep, die antigeen kregen toegediend 16 weken na de laatste bestraling, bleken zowel tot de produktie van de eerste als de tweede fase IgG in staat (fig. 10).

Het titerverloop na toediening van paardengammaglobuline aan T-celloze bestraalde dieren 5, 7 of 17 weken na de laatste bestraling is weergegeven in fig. 11. In geen van deze dieren was de anti-

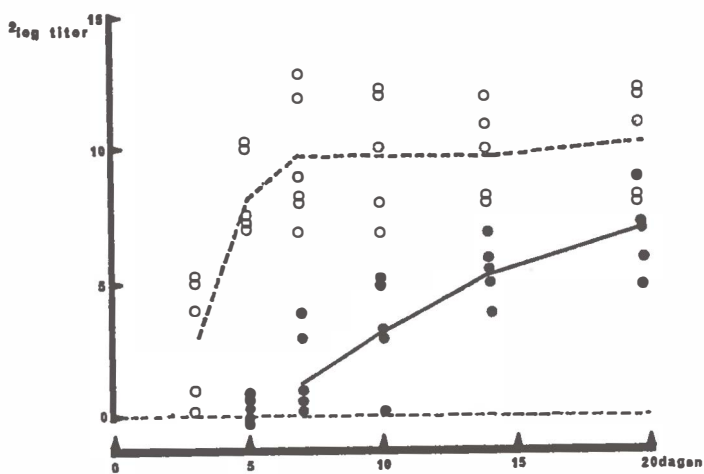


Fig. 9. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 8 weken na de laatste van drie subletale bestralingen uitgevoerd met thymus bescherming.

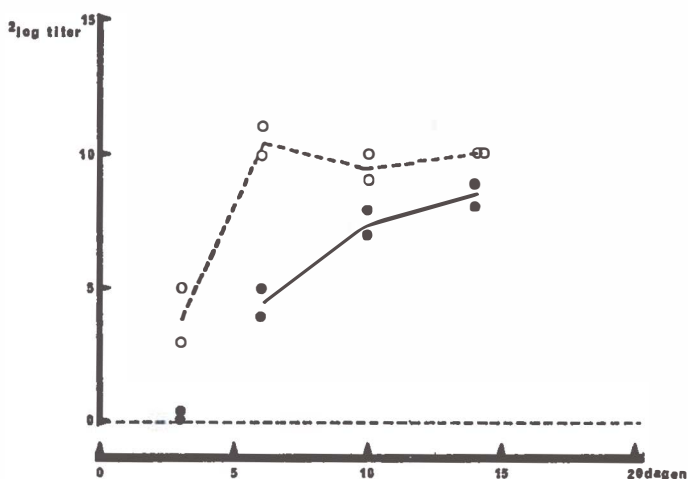


Fig. 10. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 16 weken na de laatste van drie subletale bestralingen, uitgevoerd met thymus bescherming.

lichaamproduktie tegen paardengammaglobuline waarneembaar. De antilichaamvorming in de dieren uit de controlegroep, die 9 weken na de laatste bestraling met thymusbescherming paardengammaglobuline kregen, bestaat zowel uit IgM als uit IgG productie. In hoeverre het titerverloop in deze laatste groep dieren geheel normaal is, is door de vrij aanzienlijke spreiding van de haemagglutinatietiters moeilijk te beoordelen (fig. 12).

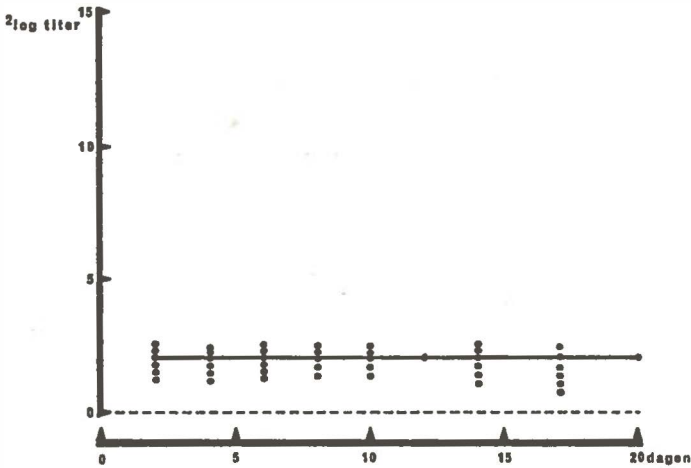


Fig. 11. Titerverloop van de Pgg antilichamen na: Pgg toediening 5 tot 17 weken na de laatste van drie subletale bestralingen van gethymectomeerde dieren.

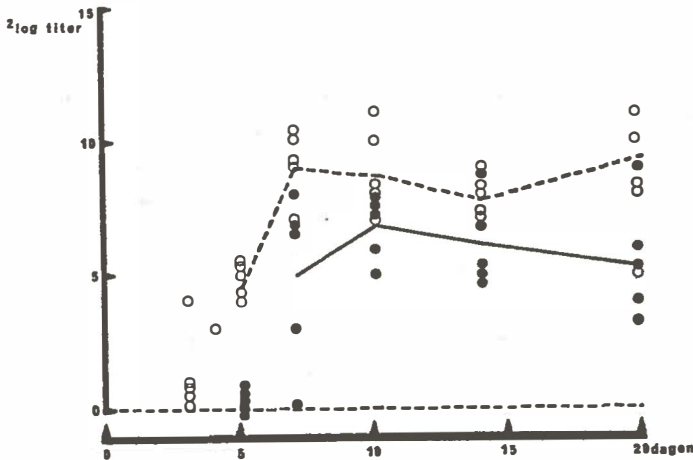


Fig. 12. Titerverloop van de Pgg antilichamen na: Pgg toediening 9 weken na de laatste van drie subletale bestralingen, uitgevoerd met thymus bescherming.

Discussie

Konijnen zonder thymus en zonder T-cellen zijn niet in staat tot de produktie van IgG antilichamen, noch tegen paratyfusvaccin, noch tegen paardengammaglobuline. Er werden geen aanwijzingen gevonden voor het bestaan van enige vorm van kruisreactiviteit tussen deze twee antigenen. We menen te mogen concluderen, dat de thymus afhankelijkheid van IgG produktie niet een gevolg is van de eigenschappen van bepaalde antigenen, maar van de eigenschappen van het lymfoïde apparaat van het konijn.

Zijn deze eigenschappen exclusief voor het konijn? In de neonataal gethymectomeerde muis is tegen een aantal antigenen een volledig normale antilichaamproduktie mogelijk, bijv. tegen het pneumococcal polysaccharide (DAVIES c.s. 1970). Tegen dit antigeen worden echter ook in normale muizen nauwelijks of geen IgG antilichamen geproduceerd. Toegediend in een normale dosering leiden schape-erythrocyten in deze neonataal gethymectomeerde muizen tot een zeer geringe (IgM) antilichaamvorming; wanneer een veel hogere dosering gebruikt wordt, kan zelfs een ongeveer normale titerhoogte worden bereikt (TAYLOR en WORTIS 1968). Ook dit „concentratie” effect lijkt echter alleen voor de IgM produktie te gelden (TAYLOR 1971).

Er zijn ons geen experimenten bekend, waaruit blijkt dat T-cellose proefdieren in staat zijn tot IgG produktie in de primaire reactie. Het is mogelijk dat de immunologische eigenschappen van de mens anders zijn. GOOD stelt dat antilichaamvorming in de mens niet van de thymus afhankelijk is; hij baseert dit op waarnemingen in patiënten die lijden aan een aanlegstoornis van het 3e en 4e kieuwspleet entoderm (syndroom van Di George). Deze patiënten hebben normale immuunglobuline-spiegels, en vertonen normale reacties tegen toegediende antigenen. (GOOD and CAIN 1970). DI GEORGE meent echter, dat een aantal van de beschreven patiënten toch wel over een zekere thymus aanleg beschikken. In patiënten die, naar hij aanneemt geen T-cellen bezitten, vindt geen antilichaamproduktie of een geringe IgM synthese plaats, terwijl er in de circulerende antilichamen geen specificiteit aantoonbaar zou zijn (LISCHNER 1967, LISCHNER en DI GEORGE 1969).

Twee conclusies kunnen uit deze en onze waarnemingen worden getrokken. In de eerste plaats is er alle reden om aan te nemen dat de thymus afhankelijkheid van de IgG synthese niet beperkt is tot het konijn. In de tweede plaats is het duidelijk dat in een aantal situaties IgM produktie schijnbaar zonder hulp van T-cellen mogelijk is. Ten aanzien van deze laatste conclusie moet echter wel worden bedacht, dat een volstrekte afwezigheid van T-cellen in de meeste proefopstellingen niet wordt bereikt. Dat geldt met name voor neonataal gethymectomeerde muizen, maar in een aantal gevallen ook voor de door ons gebruikte combinatie van thymectomie en herhaalde bestraling (zie blz. 88). Het is dus mogelijk dat de thymus onafhankelijkheid van bijv. antiparatyfus-H IgM produktie relatief is, in die zin, dat voor het funktioneren van een groot aantal B-cellen maar weinig T-cellen nodig zouden zijn.

De thymus afhankelijkheid van IgG produktie lijkt een eigenschap te zijn van dat deel van het lymfoïde apparaat, dat voor die produktie verantwoordelijk is, met name van de B-cellen. Het lijkt onwaarschijnlijk dat ditzelfde geldt voor B-cellen met de competentie tot thymus afhankelijke IgM produktie. FELDMAN en BASTEN (1971) toonden aan, dat de thymus afhankelijkheid van IgM produktie tegen flagelline niet bepaald wordt door de „haptene” determinant van dat antigeen: IgM vorming tegen gepolymeriseerd flagelline was thymus onafhankelijk, die tegen monomeer flagelline en tegen monomeer flagelline gekoppeld aan ezel-erythrocyten, was thymus afhankelijk. In al deze gevallen is de haptene groep dezelfde. Het is niet waarschijnlijk dat de aangesproken B-cellen in deze situaties verschilden. De thymus afhankelijkheid van IgM produktie tegen een bepaald antigeen lijkt derhalve in de eerste plaats te worden bepaald door de eigenschappen van het antigeen. In het algemeen lijken vooral „kleine” antigenen thymus afhankelijk te zijn t.a.v. de IgM produktie. Mogelijk is er een relatie tussen het aantal determinanten op het antigeen-molecuul en de thymus afhankelijkheid van de IgM synthese tegen dat antigeen.

Eén van de konsekwenties van de bovenomschreven hypothesen is, dat er verschil bestaat tussen de eigenschappen van een B-cel die voorloper is van een IgM producerende cel en van een B-cel die de competentie heeft tot IgG produktie. Een aantal aspecten van de

levensloop van de IgM-voorouder celsoort is beschreven door NIEUWENHUIS (1971). Van de IgG voorlopers wordt zelfs het bestaan als een aparte celsoort niet algemeen erkend. Het verloop van de antilichaamvorming in de boven beschreven experimenten (fig. 9) suggereert echter een mogelijkheid om deze cel te identificeren. Het bleek namelijk dat na een drie keer herhaalde subletale bestraling geen IgG synthese mogelijk was, wanneer er geen T-cellen waren. Maar zelfs wanneer er, door de thymus bescherming wel T-cellen waren, bleek de IgG produktie lang na de bestraling nog niet normaal. Blijkbaar interfereert ook de röntgenbestraling met de IgG antilichaamproduktie.

Na een *éénmalige*, subletale bestraling was gedurende enige tijd zowel vorming van IgM als van IgG antilichamen onmogelijk. Vanaf ± 7 dagen na de bestraling vond een snel herstel plaats van het vermogen tot IgM produktie (KEUNING c.s. 1964). Het herstel van het vermogen tot IgG synthese werd in deze experimenten echter niet onderzocht. De vraag rijst, of ook na een dergelijke *éénmalige* bestraling een vertraging van het herstel van het vermogen tot IgG synthese waarneembaar is. De beantwoording van die vraag kan van belang zijn, omdat in ieder geval het herstel van de groep immuno-competente cellen voorwaarde is voor het herstel van het vermogen tot antilichaamsynthese. Wanneer het vermogen tot IgM synthese sneller terugkeert dan de IgG competentie, dan zou dit kunnen betekenen, dat de produktie van immunocompetente cellen voor de ene klasse antilichamen anders verloopt dan voor de andere. Dit zou erop kunnen wijzen dat voor IgM produktie andere immuno-competente cellen nodig zijn dan voor de IgG produktie.

Immunocompetente cellen voor de IgM synthese tegen paratyfus-H-vaccin behoren uitsluitend tot de B-cellen; bij de IgG synthese spelen naast B- ook T-cellen een rol. Beide celgroepen worden door een bestraling gedecimeerd. Het herstel van beide groepen bepaalt dus ook het herstel van het antilichaamproduktie-vermogen.

In de volgende experimenten hebben we geprobeerd het herstel van het vermogen tot antilichaamproduktie na een bestraling te kwantificeren. Vervolgens werd getracht de betekenis van T- en B-cellen voor dat herstel te analyseren.

Experimenten

De snelheid van het herstel van het vermogen tot antilichaam-produktie werd bepaald na een éénmalige, totale bestraling (450 rad), door 7, 10, 16 of 23 dagen na de bestraling paratyfus vaccin ($5 \cdot 10^8$ micro-organismen) intraveneus toe te dienen. In een tweede serie experimenten werd het effect van thymus-bescherming tijdens de bestraling bepaald. Zeven of 16 dagen na een dergelijke bestraling werd op dezelfde wijze als boven geïmmuniseerd.

Resultaten

De titercurves van de dieren die 7, 10, 16 of 23 dagen na de totale lichaamsbestraling antigeen ontvingen zijn weergegeven in fig. 13, 14, 15, 16. Die van de dieren die 7 of 16 dagen na bestraling met thymus bescherming werden geïmmuniseerd in fig. 17, 18.

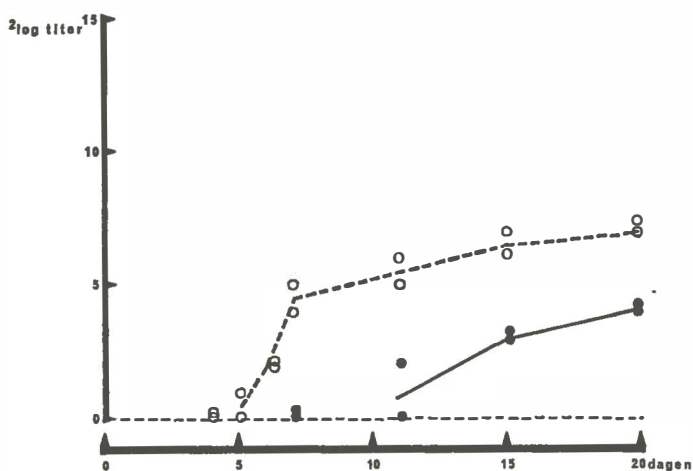


Fig. 13. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 7 dagen na een subletale bestraling (450 rad).

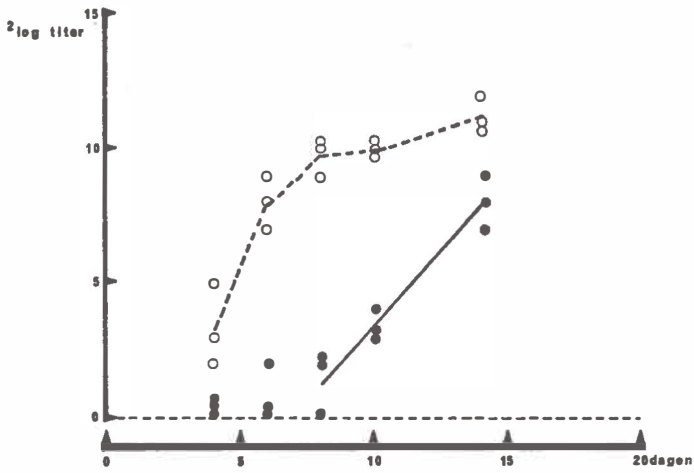


Fig. 14. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 10 dagen na een subletale bestraling (450 rad).

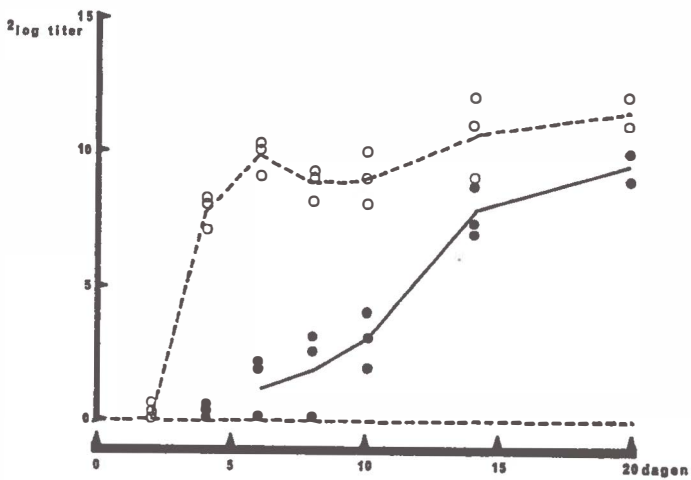


Fig. 15. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 16 dagen na een subletale bestraling (450 rad).

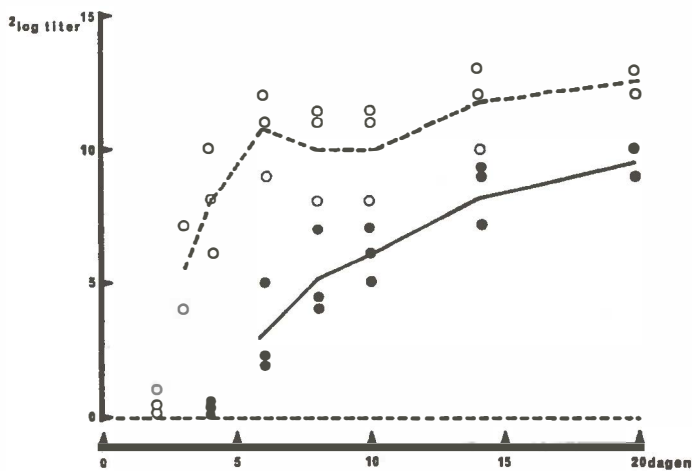


Fig. 16. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 23 dagen na een subletale bestraling.

IgM synthese

Als parameter voor de IgM productie werd de totale antilichaamtiter op de 6e dag gebruikt, d.w.z. de post-logfase-piektiter. De hoogte van deze titer is evenredig met het aantal geïnduceerde IgM

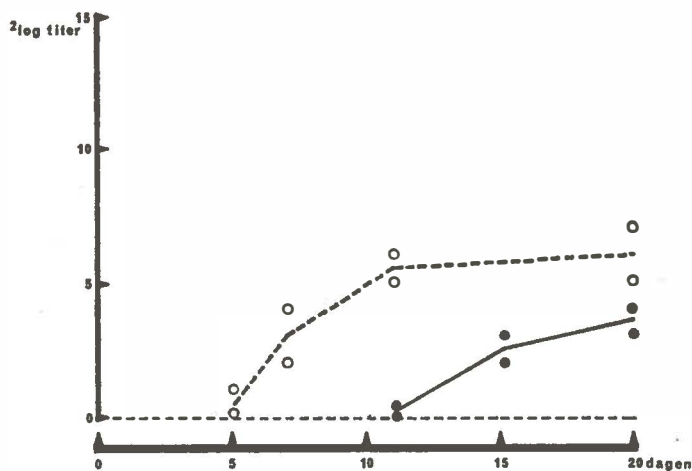


Fig. 17. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening op 7 dagen na een subletale bestraling, uitgevoerd met thymus bescherming.

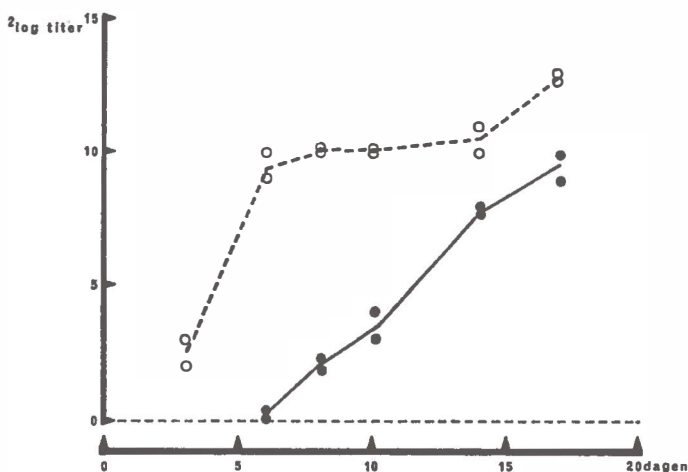


Fig. 18. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening op 16 dagen na een subletale bestraling, uitgevoerd met thymus bescherming.

B-cellen. Wanneer antigeen op verschillende dagen na een bestraling wordt toegediend, geven deze waarden een beeld van de snelheid waarmee het IgM productievermogen terugkeert. Tussen de 10e en de 16e dag na de bestraling bereikte dit productievermogen weer het normale peil. Geheel in overeenstemming met eerdere waarnemingen (MULDER en v. EYCK, niet gepubl.) lijkt dit vermogen zich exponentieel te herstellen, met één verdubbeling per ± 12 uur (fig. 21).

IgG synthese

Als parameter van de eerste fase van de IgG productie werd de titer van de mercapto-ethanol resistente antilichamen op de 8e dag na antigeen toediening bepaald. Voor de tweede fase was de 14e dags titer van deze antilichamen het meetpunt. Gemeten naar deze parameter lijkt de eerste fase van de IgG synthese zelfs 23 dagen na een éénmalige bestraling nog ernstig gestoord. Toch lijkt tussen de 7e en de 23e dag een zeker herstel plaats te vinden. De verdubbelingstijd van dit herstel, voorzover het exponentieel verloopt, bedraagt ongeveer 4 dagen. De tweede fase van de IgG productie is reeds op de 10e dag weer volledig hersteld. Dit betekent, dat dit herstel tenminste even snel verloopt als het herstel van het vermogen tot IgM productie.

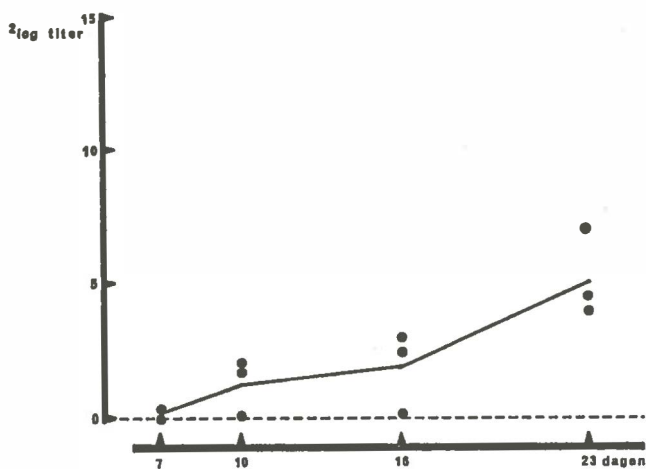


Fig. 19. Verloop van het herstel van het H-agglutinin productie vermogen, met als parameter de IgG titer die bereikt wordt op de 8e dag na Paratyfus toediening op resp. 7, 10, 16 en 23 dagen na subletale bestraling.

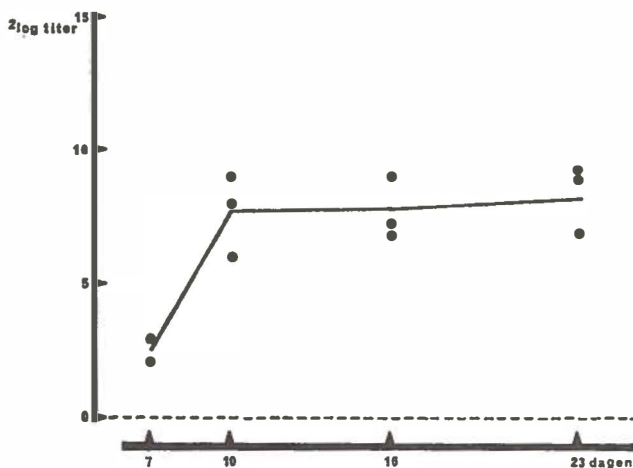


Fig. 20. Verloop van het herstel van het H-agglutinin-productie vermogen, met als parameter de IgG titer die bereikt wordt op de 14e dag na Paratyfus toediening op resp. 7, 10, 16 en 23 dagen na subletale bestraling.

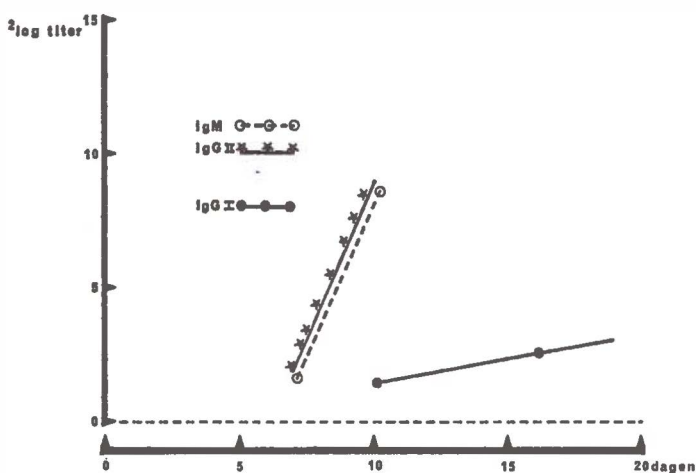


Fig. 21. Verloop van het herstel van het IgM productie vermogen, van het IgG eerste fase productie vermogen, en van het IgG tweede fase productie vermogen na een eenmalige subletale bestraling.

Effekt van thymus bescherming tijdens een éénmalige bestraling

Het titerverloop na antigeen toediening op de 7e of 16e dag na een bestraling (450 rad), lijkt niet te worden beïnvloed door bescherming van de thymus tijdens die bestraling (fig. 17, 18).

Discussie

De waarneming dat het vermogen tot IgG synthese in een dier dat drie maal bestraald is, ondanks de bescherming van de thymus, pas lange tijd (8-16 weken) na de laatste bestraling weer normaal is, leek aan te tonen dat er verschil is in de snelheid van het herstel van het vermogen tot IgM en IgG productie. Gedeeltelijk kon deze veronderstelling worden bevestigd door de waarnemingen na een éénmalige subletale bestraling. Er was een duidelijk verschil in de herstel-snelheid van het IgM produktievermogen, (verdubbelingstijd ± 12 uur) en van het vermogen tot IgG fase I productie (verdubbelingstijd 4 dagen). De tweede fase lijkt zich weer even snel te herstellen als het vermogen tot IgM-vorming.

Drie factoren, die bij de inductie van de antilichaamvorming een rol spelen, kunnen hiervoor verantwoordelijk zijn: T-cellen herstel,

regeneratie van B-cellen, of herstel van het antigeenverwerkingsmechanisme.

Antigeenverwerking

Wanneer de antigeenverwerking voor het verschil verantwoordelijk zou zijn, dan impliceert dit, dat er verschil is tussen de antigeenverwerking die leidt tot IgM en die welke leidt tot IgG produktie. Experimenten beschreven op pag. 60 tonen aan, dat de inductie van de IgG synthese nog kan worden voorkomen op een ogenblik dat dit voor de IgM synthese niet meer mogelijk is. Het is dus niet uitgesloten dat IgM- en IgG synthese een verschillend inductiemechanisme hebben.

VELDMAN (1970) suggereert dat de kortstondige antigeenlokalisatie buiten de follikels verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de inductie van de plasma-cellulaire reactie. Deze reactie is waarschijnlijk verantwoordelijk voor de IgM produktie. Het is denkbaar dat de tweede fase van de antigeenlokalisatie, waarbij het antigeen in de follikelcentra ligt (WHITE 1963, NOSSAL c.s. 1966) een rol speelt bij de inductie van andere reacties: zoals de IgG produktie.

Voor geen van beide antilichaamklassen is het inductiemechanisme bekend. Het is niet ondenkbaar dat de dendritische cellen (WHITE 1963, NOSSAL c.s. 1966) er een rol bij spelen. JAROSLAV en NOSSAL (1966) menen, dat deze cellen zeer radioresistent zijn. NETTESHEIM en HANNA (1969) daarentegen beschreven beschadiging van deze cellen, reeds na 400 rad. Wij hebben geen experimenten gedaan om vast te stellen of een eventuele radiogevoeligheid van het antigeenverwerkingsmechanisme een rol kan spelen bij het verschil in herstel van de IgM en de IgG produktie na een bestraling. Het lijkt echter onwaarschijnlijk dat deze faktor van grote betekenis zou kunnen zijn, daar substitutie met immunocompetente cellen (uit thymus en beenmerg) een letaal bestraalde muis in staat stelt tot zowel IgM als IgG produktie (MITCHELL en MILLER 1968, JACOBSON c.s. 1970). In deze experimenten bleek het geven van beenmergcellen essentieel voor een adequate substitutie. Onder deze cellen zullen weliswaar ook andere dan immunocompetente cellen voorkomen, met name mononucleaire macrofagen. Het is echter onwaarschijnlijk, dat juist deze cellen verantwoordelijk zouden zijn voor een betere antigeenverwer-

king. In experimenten van WILLIAMS (1966 a. b.) en van NETTESHEIM en HAMMONS (1971) bleek bescherming van, resp. substitutie met beenmerg niet in staat om bijv. de verminderde folliculaire antigeen-concentratie, die na een bestraling optreedt, te verbeteren. Uit bovengenoemde waarnemingen zou men derhalve kunnen concluderen dat het niet waarschijnlijk is dat een verstoring van de antigeen-verwerking in aanzienlijke mate het herstel van het antilichaam-produktievermogen na een bestraling beïnvloedt.

Herstel van T-cellen

Kan het verschil in herstelsnelheid van IgM en IgG fase I synthese na een bestraling het gevolg zijn van een tekort aan T-cellen?

Na een 3 x herhaalde subletale bestraling, uitgevoerd met bescherming van de thymus, bleef de eerste fase van de IgG synthese langdurig afwezig (fig. 10). De thymus afhankelijke gebieden van het lymfoïde apparaat vertonen morfologisch reeds zeer kort na de laatste bestraling (24 uur) tekenen van herstel. Ook de functie van deze cellen in de specifiek cellulaire reactie is normaal. (VELDMAN 1970). Door een éénmalige subletale bestraling worden waarschijnlijk zowel T- als B-cellen gedood. Een aantal onderzoekers beschrijft dat de helperfunctie van T-cellen relatief radioresistent is. (KETT-MAN en DUTTON 1971). MITCHISON (1971b), vond bij bestraling pas na een dosis boven 600 rad een sterke daling van de helpercelfunctie. Het lijkt dus niet waarschijnlijk dat na een éénmalige subletale bestraling een aanzienlijk tekort aan T-cellen bestaat.

Onze experimenten leveren nog twee argumenten tegen de veronderstelling dat een tekort aan T-cellen verantwoordelijk is voor het trage herstel van de eerste fase van de IgG synthese: Ondanks thymus bescherming tijdens de bestraling is 7 resp. 16 dagen daarna nog geen IgG-fase-I produktie waarneembaar. Tenslotte blijkt uit het zeer snelle herstel van de tweede fase van de IgG synthese na een bestraling, dat voor deze eveneens thymus-afhankelijke antilichaamvorming wel voldoende T-cellen aanwezig zijn.

Herstel van B-cellen

Het verschil in de herstelsnelheid van het vermogen tot IgM en

het vermogen tot IgG-fase-I produktie na een bestraling lijkt vooral te berusten op een verschil in de snelheid van het herstel van de betrokken B-cel populaties. Is er reden om aan te nemen dat er verschil is, tussen cellen die competent zijn voor de IgG en cellen die competent zijn voor de IgM synthese?

B-cellen met de competentie tot IgG synthese zijn in de muis afkomstig uit het beenmerg (JACOBSON c.s. 1970). IgM B-cellen komen in het konijn uit reactieve follikelcentra, bij dat dier voornamelijk gelokaliseerd in de appendix (NIEUWENHUIS 1971). Dit verschil in herkomst zou echter schijnbaar kunnen zijn: Eén van de bronnen van de cellen die verantwoordelijk zijn voor een follikelcentrumreactie is het beenmerg. Het is dus niet onwaarschijnlijk dat ook de immunocompetente cel voor de IgM synthese, of althans een voorstadium daarvan, uit het beenmerg afkomstig is (NIEUWENHUIS 1971). Daar ook in de experimenten van JACOBSON (zie boven) enige tijd verloopt tussen beenmergsubstitutie en antigeentoediening is het niet onmogelijk dat ook deze beenmergcellen een follikelcentrumreactie doormaken. Deze experimenten geven dus geen uitsluitsel over de vraag of er verschil is tussen IgM- en IgG B-cellen.

Wanneer men aanneemt dat een IgM producerende cel op een zeker ogenblik overgaat tot IgG produktie (switch theorie), dan betekent dit, dat de B-cellen voor IgG en voor IgM produktie identiek zijn. De waarschijnlijkheid dat een dergelijk switch-mechanisme verantwoordelijk is voor een belangrijk deel van de IgG produktie lijkt echter gering. Weliswaar is het voorkomen beschreven van cellen die zowel IgM als IgG produceren ("double producers", NOSSAL c.s. 1964) doch in andere experimenten bleek hun aantal zeer gering. Daarbij komt dat er omstreeks het tijdstip dat IgG synthese waarneembaar wordt, geen toename van hun aantal is (NUSSENZWEIG c.s. 1968, COSENZA en NORDIN 1970). Uitzonderingen op de regel dat double producers zeldzaam zijn, worden beschreven door KINCADE c.s. (1970), die een hoog percentage in de bursa fabricius vonden en door FINEGOLD c.s. (1967) die double producers waarnamen in gekweekte pathologische cellen. Ook een waarneming van WANG c.s. (1969) die een dubbelmyeloom beschrijft waarin de variabele delen van IgM en IgG moleculen eenzelfde aminozuurvolgorde hebben - waarbij overigens geen "double producers" zijn gevonden -, wijst

erop, dat voor een mogelijk onvolledig gedifferentieerde cel een switch niet uitgesloten is. Ook deze maligne cellen vertonen echter blijkens de zeldzaamheid van het dubbel myeloom, slechts een zeer geringe neiging tot "switch".

Bovenstaande overwegingen rechtvaardigen de hypothese dat "switch" van IgM naar IgG produktie eerder uitzondering dan regel is, en dat beide antilichaamklassen onder normale omstandigheden in verschillende cellen worden gevormd. Dat betekent, dat ook de mogelijkheid dat de voorlopers van die cellen verschillend zijn, overweging verdient.

Herstel van het IgM-produktievermogen na een bestraling bleek in experimenten van NIEUWENHUIS (1971) plaats te vinden vanuit de appendix, die tijdens de bestraling was beschermd. In een proefopstelling die vergelijkbaar was met die van NIEUWENHUIS, werd nagegaan of IgG-B-cellen eenzelfde bron hebben.

Experimenten

Wanneer B-cellen voor de IgG synthese uit de appendix afkomstig zijn, is het te verwachten, dat bescherming van dat orgaan tijdens de bestraling het herstel van het vermogen tot IgG produktie zal versnellen.

De antilichaamproduktie werd bepaald in een groep dieren die 10 dagen na een bestraling (450 rad) met appendix bescherming paratyfus (5.10^8 micro-organismen) intraveneus kregen toegediend. Als referentie groep werden dieren gebruikt die 10 dagen na een totale bestraling (450 rad) paratyfus (5.10^8 micro-organismen intraveneus) kregen.

In een tweede, a.h.w. komplementaire serie experimenten werd in de bestraalde milt de influx toegelaten van cellen uit de onbestraalde periferie. Behalve uit de appendix, zou in dit geval ook uit alle andere potentiële bronnen aanvoer van B-cellen naar de milt mogelijk zijn. Dit experiment werd uitgevoerd door de milt lokaal te bestralen (750 rad). Vijf dagen na de lokale bestraling werd paratyfusvaccin (5.10^8 m.o.i.v.) gegeven. Zes uur na deze immunisatie werd een dosis hyperimmuunserum toegediend, resulterend in een titer van ± 2 . De bedoeling van deze passieve immunisatie was de

antilichaamproduktie te beperken tot de bestraalde milt (Bos 1967). Eén van de effecten van een dergelijk passieve immunisatie is dat de IgG produktie in de eerste fase een minder hoge titer bereikt. Om dit effect kwantitatief te kunnen beoordelen is de antilichaamproduktie waartoe normale dieren in staat zijn na actieve (paratyfus $5 \cdot 10^8$ m.o. i.v.), gevolgd door passieve immunisatie bepaald in 2 dieren (fig. 25).

Resultaten

Het toedienen van antigeen 10 dagen na een bestraling met bescherming van de appendix, leidde tot een antilichaamproduktie, die wat de IgG synthese betreft niet compleet is. Uit fig. 22 blijkt

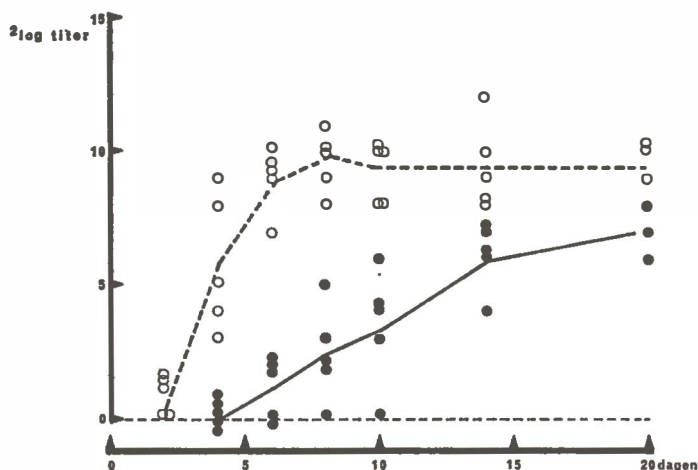


Fig. 22. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 10 dagen na een subletale bestraling uitgevoerd met appendix bescherming.

dat de IgG produktie gedurende de eerste dagen geen snelle stijging doormaakt. Fig. 23 toont dat het herstel van het vermogen tot produktie van IgG-fase-I (titer van de m.e. resistente antilichamen op de 8e dag) een vrij grote spreiding vertoonde, maar toch niet duidelijk afweek van het herstel, dat op dat ogenblik werd bereikt, wanneer de appendix tijdens de bestraling niet werd beschermd. Uit het verdere verloop van de antilichaamproduktie, dat is weergegeven in

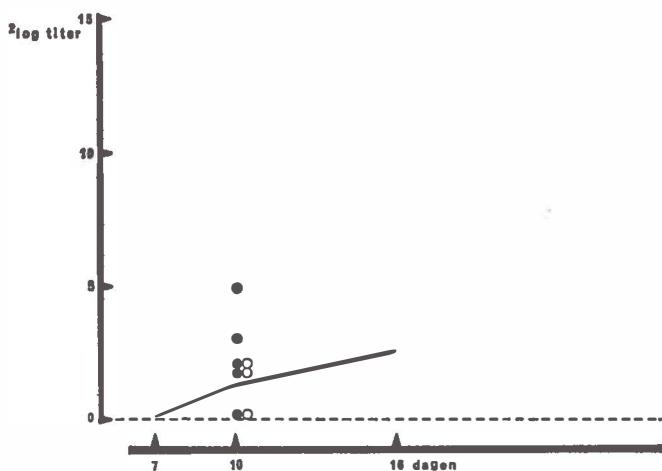


Fig. 23. Verloop van het herstel van het vermogen tot eerste fase IgG productie na een subletale bestraling met (zwarte punten) of zonder (witte punten) bescherming van de appendix.

fig. 22, blijkt tevens dat de tweede fase van de IgG productie wel plaats vindt. De parameter van deze fase, de 14e dags titer, bereikt dezelfde waarde als in de controle-dieren die bestraald werden zonder bescherming van de appendix (zie fig. 14).

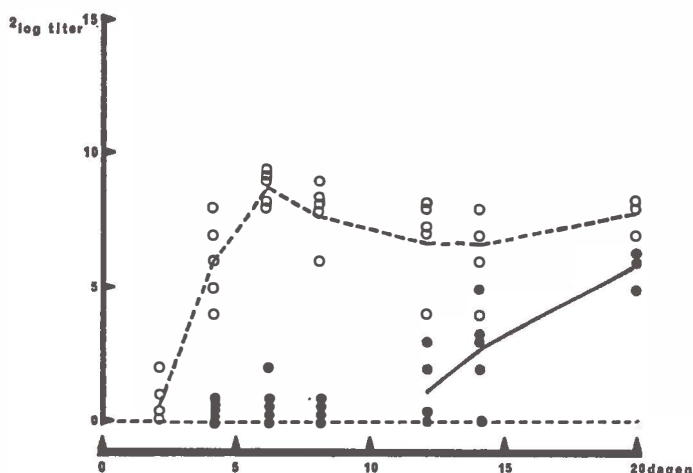


Fig. 24. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 5 dagen na bestraling van de milt (750 rad); 6 uur na de immunisatie werd een dosis hyperimmuunserum gegeven.

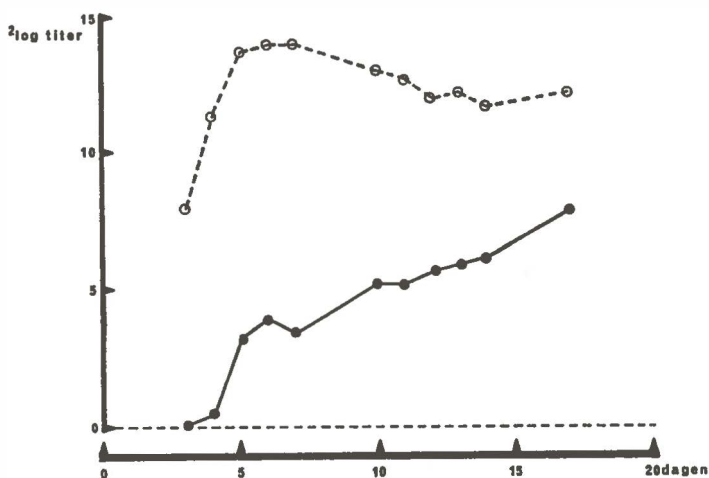


Fig. 25. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening, na 6 uur gevolgd door een dosis hyperimmuunserum. (Experiment van Dr. A. A. v. d. Broek).

Na een lokale bestraling van de milt (fig. 24) bleek gedurende tenminste 10 dagen geen IgG synthese waarneembaar te zijn. Na die periode vond in het serum een titerstijging van IgG plaats, die een kinetiek vertoont, overeenkomend met die van de tweede fase van de IgG produktie. De passieve immunisatie die in deze proefopstelling werd toegepast, leidde er in een normaal dier toe, dat de IgG fase I produktie een titerhoogte van ± 5 bereikte op de 8e dag (fig. 25). Zonder passieve immunisatie (fig. 1) is deze waarde ± 9 .

Discussie

Het trage herstel van het vermogen tot IgG fase I produktie na een bestraling leek niet te berusten op een langzame regeneratie van het T-cellen systeem. Evenmin leek het waarschijnlijk dat een langdurige verstoring van de antigeenverwerking hiervoor verantwoordelijk was (zie pag. 39). Bij de hier beschreven experimenten vormde de hypothese dat de regeneratiesnelheid van het B-cellen systeem bepalend was voor het herstel van de produktie van de eerste fase, het uitgangspunt.

Zowel de experimenten waarin tijdens de bestraling de appendix

werd beschermd, als de experimenten waarin alleen de milt werd bestraald, wezen erop dat uit de periferie geen B-cellen voor deze eerste fase naar de milt migreren. Een dergelijke migratie werd door NIEUWENHUIS (1971) wel gevonden t.a.v. de immunocompetente cel voor de IgM produktie. Deze cellen bleken in het konijn voornamelijk in de appendix geproduceerd te worden, en wel in de in dat orgaan voortdurend aanwezige reactieve follikelcentra. De specificiteit van de in een follikelcentrumreactie geproduceerde immunocompetente cellen voor de IgM synthese, was niet beperkt tot die van het antigeen dat de reactie induceerde. Zo bleken in de follikelcentrumreactie tegen Pgg in de milt, cellen gevormd te worden, die in staat zijn te reageren op het niet kruis-reagerende paratyfus-H antigeen. Blijkbaar vindt in een follikelcentrumreactie vermenigvuldiging plaats van immunocompetente cellen voor de IgM synthese, die tezamen een bijzonder breed, mogelijk zelfs het volledige, spectrum van specificiteiten vertegenwoordigen.

Onze waarneming dat bescherming van de appendix het herstel van de IgG-fase-I synthese in een bestraalde milt niet beïnvloedt, kan op twee manieren worden verklaard: ofwel er vindt in een follikelcentrumreactie geen vermenigvuldiging van het volledige spectrum aan specificiteiten voor de IgG synthese plaats, ofwel deze produktie vindt wel plaats, maar de gevormde cellen zijn niet in staat het orgaan waarin ze zijn ontstaan te verlaten. Deze laatste mogelijkheid, die inhoudt dat B-cellen voor de eerste fase van de IgG synthese niet mobiel zijn, is ook gesuggereerd door ROBBINS en SMITH (1964). Zij vonden na een bestraling (1000 R!) geen herstel van de eerste fase van de IgG synthese, ondanks de bescherming van een aantal lymfoïde organen tijdens de bestraling. De in deze experimenten gebruikte röntgendosering elimineert ongetwijfeld het grootste deel van de T-cellen; de korte periode (1 uur) tussen bestraling en antigeentoediening maakt een herstel van dit systeem onmogelijk. Er is dus reden om aan te nemen, dat in de experimenten van ROBBINS en SMITH tenminste twee factoren die een rol spelen bij de IgG synthese ontbreken, nl. de T- en de B-cellen.

In onze experimenten bleek na een bestraling wel produktie van de tweede fase IgG mogelijk. Die was zowel na een totale bestraling met of zonder appendixbescherming, als na een lokale miltbestraling

aantoonbaar. Uit de door ROBBINS en SMITH (zie boven) weergegeven titercurves blijkt, dat dit ook in hun experimenten het geval was, al vermelden zij dit punt verder niet.

De mogelijkheid dat cellen voor de IgG fase I synthese niet mobiel zijn, en dus ter plaatse worden gevormd door vermenigvuldiging van cellen die tezamen alle specificiteiten vertegenwoordigen, kan worden getoetst door achtereenvolgens twee niet-kruisreagerende antigenen aan te bieden. Wanneer dit tweede antigeen intraveneus wordt toegediend, ontstaat een reactie die zich voornamelijk in de milt afspeelt, zodat de eventueel als gevolg van het vorige antigene contact geproduceerde cellen ook worden aangesproken wanneer ze hun produktieplaats niet kunnen verlaten.

Experimenten

Het bovengenoemde experiment werd uitgevoerd door aan een groep dieren vóór of na een subletale totale lichaamsbestraling (450 rad) eerst paardengammaglobuline aan te bieden. Een aantal dagen hierna werd paratyfusvaccin gegeven. Het hier gebruikte paardengammaglobuline werd verkregen door een herhaalde uitzouting met Na_2SO_4 (16,5 %) (zie v. BUCHEM 1962, THORBECKE 1954). De dosering van dit antigeen bedroeg 10 mg., intraveneus toegediend. De eerste groep dieren kreeg 5 dagen voor de bestraling Pgg, en 10 dagen na de bestraling paratyfus. De tweede groep kreeg 7 dagen na de bestraling Pgg en 9 dagen later paratyfusvaccin (2 dieren). De derde groep kreeg op de 16e dag na de bestraling paardengammaglobuline en op de 23e dag paratyfus. De dosering van het paratyfusvaccin was steeds $5 \cdot 10^8$ m.o. i.v. De resultaten kunnen worden vergeleken met de titercurves uit fig. 13 t/m 16, die de antilichaamvorming weergeven op dezelfde dagen na een bestraling, zonder paardengammaglobulinetoediening.

Resultaten

De antilichaamproduktie tegen paratyfus-H antigeen, toegediend 10 dagen na een bestraling in een met Pgg geïmmuniseerd dier, bestond gedurende een aantal dagen alleen uit IgM. De eerste fase van de IgG synthese ontbrak (fig. 26). Ook wanneer Pgg niet vóór,

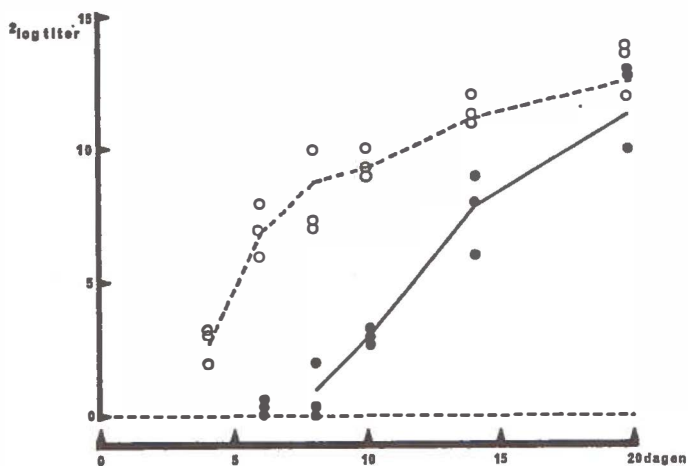


Fig. 26. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 10 dagen na subletale bestraling. 5 Dagen vóór de bestraling werd Pgg toegediend.

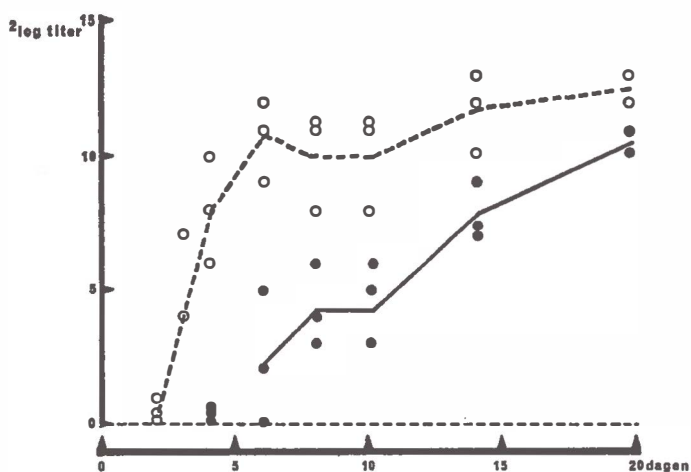


Fig. 27. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 23 dagen na subletale bestraling. 7 Dagen vóór deze immunisatie werd Pgg toegediend.

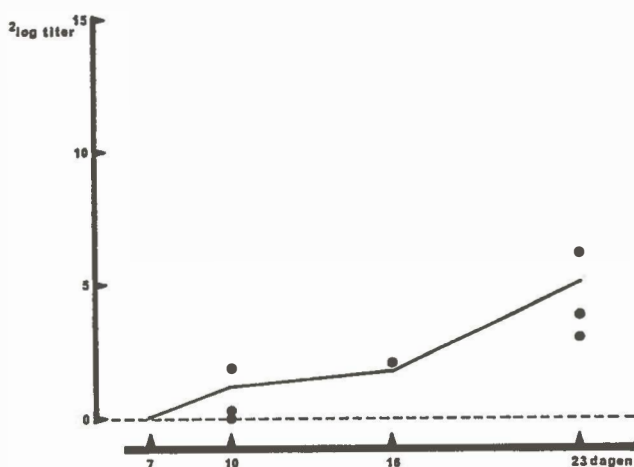


Fig. 28. Verloop van het herstel van het vermogen tot eerste fase IgG produktie - anti paratyfus - na een subletale bestraling met of zonder Pgg toediening. Parameter 8e dags IgG titer na paratyfus toediening op resp. 10, 16, of 23 dagen na een eenmalige bestraling (met Pgg immunisatie: zwarte punten, zonder Pgg immunisatie: getrokken lijn).

maar na de bestraling werd gegeven, trad geen versnelling op van het herstel van het vermogen tot IgG eerste fase produktie (fig. 27). De 8e dags IgG titers wijken voor met Pgg behandelde dieren niet af van de herstelcurve zoals die zonder Pgg verloopt (fig. 28).

Discussie

De produktie van immunocompetente cellen kan door een antigeen worden geïnduceerd, maar kan ook autonoom tot stand komen. De door een antigeen geïnduceerde produktie van immunocompetente cellen omvat de vorming van memorycellen, d.w.z. cellen met een volledig op het antigeen passende specificiteit. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat ook cellen met een andere specificiteit worden gevormd, of vermenigvuldigd. NIEUWENHUIS (1971) toonde aan dat dit met name geldt voor B-cellen met de competentie tot IgM produktie. Ook experimenten van HASKILL (1969) wijzen in die richting. Autonome produktie van immunocompetente cellen lijkt plaats te vinden in de thymus, en mogelijk in de bursa Fabricii van de kip. Bij zoogdieren is een orgaan dat autonoom competente B-cellen

produceert niet aangetoond. Ook de waarneming dat in een bestraalde milt ondanks een 5 dagen durende influx van cellen uit de bloedbaan geen eerste fase IgG synthese plaats vond, lijkt niet te wijzen op het bestaan van een orgaan dat autonoom IgG B-cellen vormt.

Wij hebben er echter ook geen aanwijzingen voor gevonden, dat een kontakt met een antigeen leidt tot de produktie van IgG B-cellen die competent zijn voor de IgG eerste fase produktie.

Wanneer de produktie van immunocompetente cellen voor de IgG eerste fase, niet autonoom verloopt, maar wordt opgewekt door een antigeen en niet door een niet-kruis-reagerend antigeen, lijkt als enige alternatief over te blijven, dat die inductie het werk is van een wel-kruis-reagerend antigeen.

In dat verband lijkt de vraag relevant of deze cellen in een voor het betreffende antigeen virginaal dier wel aanwezig zijn; het alternatief zou zijn, dat ze pas geproduceerd worden tijdens het verloop van de primaire reactie, door het kontakt met het antigeen waartegen ze meteen antilichamen gaan produceren. Deze laatste mogelijkheid lijkt, althans wat de eerste fase van de IgG produktie betreft, niet reëel te zijn. In de eerste plaats lijkt na een bestraling een spontaan herstel van de eerste fase van de IgG synthese plaats te vinden (fig. 21), dus zonder dat in die periode het specifieke antigeen wordt toegediend. Ten tweede begint de eerste fase op een moment dat nog nauwelijks enige proliferatie van betekenis in het follikelcentrum kan zijn opgetreden. Tenslotte verklaart deze hypothese niet waarom IgG synthese niet plaats vindt in een bestraalde milt, hoewel daar een normale influx van cellen voor follikelcentrum-reactie en plasmacellulaire reactie plaats vindt.

Waarschijnlijk zijn IgG B-cellen dus inderdaad ook in een voor het betreffende antigeen virginaal dier aanwezig; ze zijn echter niet „spontaan” gevormd, en evenmin is hun vorming geïnduceerd door antigenen met een volledig andere specificiteit. Blijkbaar leidt een antigeen kontakt behalve tot een aspecifieke proliferatie van IgM B-cellen, ook tot een produktie van IgG B-cellen, waarvan de specificiteit niet volledig homogeen, maar wel beperkt is.

Het uitblijven van een expressie van deze cellen in de bestraalde milt, kan ofwel betekenen dat ze niet mobiel zijn, ofwel dat ze in tamelijk geringe aantallen aanwezig zijn.

Dit alles lijkt te betekenen dat in alle lymfoïde organen langzamerhand een populatie immunocompetente cellen wordt opgebouwd en dat de snelheid van deze opbouw afhangt van de frequentie van de antigene kontakten. Het is denkbaar dat in een orgaan dat aan meer kontakten is blootgesteld dan de milt, bijv. een lymfklier, een snellere opbouw plaats vindt, en dat in zo'n orgaan ook het herstel na een bestraling sneller verloopt.

IgG synthese in de primaire reactie bestaat behalve uit de eerste fase van snelle stijging ook uit een tweede fase met langzame kinetiek; deze fase wordt vooral duidelijk wanneer de eerste fase wordt onderdrukt (v. D. BROEK 1971). Het zeer snelle herstel van deze fase na een bestraling suggereert, evenals het feit dat deze fase ook na een lokale bestraling van de milt mogelijk is, dat de immunocompetente cellen voor deze tweede fase verschillen van die voor de eerste fase van de IgG synthese. Op blz. 60 worden experimenten beschreven die suggereren dat deze tweede fase van de IgG synthese en de cellen die daarvoor verantwoordelijk zijn, waarschijnlijk niet tot de primaire reactie moeten worden gerekend. Op de karakteristiek van deze cellen zullen we daar verder ingaan.

Samenvatting

Het titerverloop van de IgG synthese in de primaire reactie suggereert dat die produktie verloopt in twee fasen. De B-cellen die voor de eerste fase verantwoordelijk zijn, ontstaan als gevolg van een voorafgaand antigeen contact. Er bestaat waarschijnlijk een vrij grote overeenkomst tussen de specificiteit van deze cellen en die van het antigeen dat hun vorming induceerde. In elk geval is die overeenkomst groter dan die welke bestaat tussen antigeen en de door het contact met dat antigeen gevormde B-cellen voor de IgM produktie. Een kenmerkend verschil tussen deze twee groepen cellen is daarnaast, dat de ene groep (de IgM B-cellen) wel in voldoende mate in staat is naar een bestraalde milt te migreren, en de andere groep (IgG eerste fase B-cellen) niet.

Een tweede verschil tussen deze twee groepen cellen blijkt te liggen in hun afhankelijkheid van een T-cel wat hun inductie tot antilichaamvorming betreft: Zowel de cellen die verantwoordelijk zijn

voor de eerste als die welke competent zijn voor de tweede fase van de IgG produktie zijn afhankelijk van de aanwezigheid van T-cellen. Op de overige eigenschappen van de B-cellen voor de tweede fase van de IgG produktie zullen we elders ingaan.

Hoofdstuk IV

OPERATIONELE DEFINIËRING VAN DE SECUNDAIRE REAKTIE

Het ligt voor de hand dat een herhaling van kontakt met het antigeen voorwaarde is, voor het optreden van een secundaire reactie. Beschrijvingen van die reactie leggen i.h.a. de nadruk op die aspecten waarin de secundaire reactie afwijkt van de primaire. Meestal is de totale antilichaamproduktie hoger, de latentietijd korter, terwijl ook kwalitatieve verschillen tussen de geproduceerde antilichamen aantoonbaar zijn. Zo treedt in de secundaire reactie de IgG synthese sterk op de voorgrond en is de affiniteit van de geproduceerde antilichamen hoger.

De secundaire reactie wordt t.o.v. de primaire blijkbaar gekenmerkt door kwalitatieve en kwantitatieve verschillen in de antilichaamproduktie. Hieruit kan de konklusie worden getrokken dat niet zozeer het feit van het voorgaande kontakt met het antigeen, als wel de verandering die dat kontakt in het lymfoïde systeem achter laat, bepalend is voor het optreden van een secundaire reactie na herhaling van het kontakt.

De veranderingen in het lymfoïde apparaat die optreden tijdens de primaire reactie, spelen zich zowel op humoraal als op cellulair niveau af. Serum van een geïmmuniseerde donor stelt een niet geïmmuniseerde receptor niet in staat tot een secundaire reactie gedefinieerd naar de bereikte piek-titer, of de klasse van de geproduceerde antilichamen (fig. 32). Ductus-thoracicus-cellen uit een geïmmuniseerde donor stellen die receptor hiertoe, wanneer dezelfde criteria worden aangelegd, wel in staat (GOWANS en UHR, 1966). Blijkbaar treedt tijdens de primaire reactie tegen een antigeen een verandering op in de samenstelling van de groep immunocompetente cellen, die de specificiteit hebben van dat antigeen. Dit proces is de „memory-vorming”. Het is deze veranderde samenstelling die tot expressie komt in de secundaire reactie.

Eén van de kenmerkende aspecten van de secundaire reactie is de kwantitatief hoge antilichaamproduktie; als parameter hiervoor kan de titer hoogte worden gebruikt. De hoge antilichaam-synthese in de secundaire reactie berust op de door het eerste contact met het antigeen geïnduceerde toename van het aantal cellen, die de competentie hebben om op dat antigeen te reageren. De eigenschappen van deze cellen komen tot uiting in de kenmerkende kwalitatieve aspecten van de antilichaamproduktie: de hoge affiniteit van de gevormde antilichamen, die voornamelijk tot de IgG klasse behoren. In de hierna te beschrijven experimenten hebben we geprobeerd of, en in hoeverre kwalitatieve en kwantitatieve gegevens uit het titerverloop parameters opleveren die een bruikbare operationele definitie van de secundaire reactie mogelijk maken.

Experimenten

De meest gebruikte parameter voor de kwalifikatie van een „secundaire” reactie is de hoogte van de piek titer. Om te bepalen in hoeverre konijnen in staat zijn om op een tweede contact met paratyfus vaccin te reageren met een verhoging van de titer aan circulerende antilichamen, werd aan een groep konijnen, die 3-6 maanden te voren met 5.10^8 paratyfus micro-organismen intraveneus geïmmuniseerd waren, opnieuw intraveneus paratyfus vaccin, in een zelfde dosering toegediend.

Resultaten

Het titer verloop na restimulering van een reeds te voren geïmmuniseerd dier is weergegeven in fig. 29. De latentie tijd van de antilichaamproduktie lijkt korter te zijn dan 48 uur. De piek van de antilichaamconcentratie wordt bereikt tussen de 4e en 6e dag na antigeen toediening. De waarde van deze titer varieert tussen 10 en 15 (2 log titer). Behandeling van de sera met mercapto-ethanol leidde tot slechts weinig lagere titers. Dit verschil tussen wel en niet met mercapto-ethanol behandelde sera neemt in het verloop van de reactie af. De exponentiële stijging zowel van de m.e. gevoelige als van de m.e. ongevoelige titer verloopt met een verdubbelingstijd van 8-24 uur.

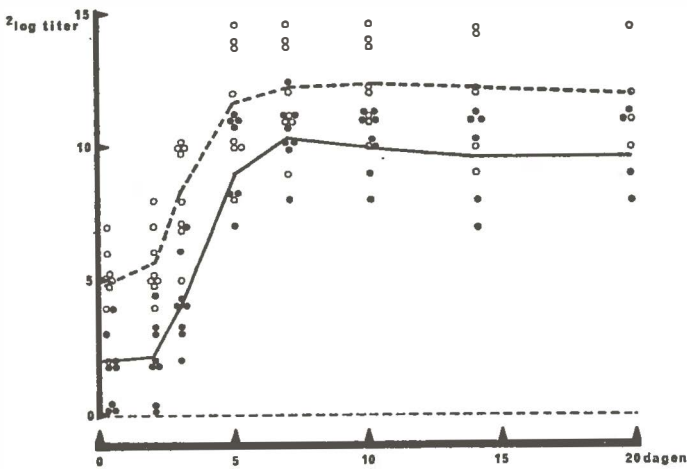


Fig. 29. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening aan dieren die 3-6 maanden tevoren met ditzelfde antigeen waren geïmmuniseerd.

Discussie

De gemiddelde waarde van de maximale antilichaamconcentratie na een tweede contact met paratyfus vaccin wijkt in konijnen weinig af van de maximale waarde in een primaire reactie (fig. 1). Wanneer men het verschil tussen deze waarden zou beschouwen als criterium voor de secundaire reactie, dan zou men moeten concluderen dat in de primaire reactie, nauwelijks kwantitatieve veranderingen in de groep immunocompetente cellen hebben plaats gevonden. Daarbij moet men dan wel bedenken dat een significante verhoging van de piek-titer pas te verwachten is bij een verdubbeling of verviervoudiging van het aantal cellen dat bij de antilichaamvorming betrokken is.

De vergelijking van de titerhoogte van de secundaire reactie met die in de primaire reactie levert dus geen bruikbare parameter op voor een operationele definiëring van de secundaire reactie tegen paratyfus vaccin in konijnen. Het titerverloop in fig. 23 toont echter aan, dat er toch wel degelijk veranderingen hebben plaats gevonden. In vergelijking met de primaire reactie is de latentietijd, vooral van de IgG productie veel korter. Er vindt verder voornamelijk productie van IgG antilichamen plaats, hoewel de vrij grote titer-daling na

behandeling met mercapto-ethanol in de sera, gewonnen op de tweede, derde en vijfde dag van de reactie, er op zouden kunnen wijzen dat er ook IgM synthese plaats vindt. Deze waarnemingen doen vermoeden dat de definiëring van de secundaire reactie voornamelijk op de aspecten van de IgG synthese moet berusten.

Bij de experimenten n.a.v. de primaire reactie werd waargenomen, dat na een lokale bestraling - van de milt - in een virginaal dier geen IgG synthese optrad, wanneer enkele dagen later paratyfus vaccin werd toegediend (fig. 24). Als verklaring van dit verschijnsel werd de mogelijkheid geopperd, dat immunocompetente cellen voor de eerste fase van de IgG synthese niet naar de bestraalde milt kunnen migreren, zodat het hier waarschijnlijk een weinig mobiele celgroep zou betreffen. In experimenten van GOWANS en UHR (1966) werd aangetoond, dat cellen uit de ductus thoracicus van een geïmmuniseerde donor rat een virginale receptor in staat stellen om volgens een „secundair-reaktiepatroon” te reageren. Als criterium voor het secundaire reaktiepatroon werd hierbij de hoge titer aan voornamelijk IgG antilichamen gebruikt. Blijkbaar komen althans in de rat „memory-cellen” voor in de ductus thoracicus. Waarschijnlijk zijn cellen uit de ductus thoracicus mobiel. Wanneer dat ook voor deze memory cellen in het konijn zou gelden, dan zou men mogen verwachten dat een bestraling van de milt in een reeds eerder geïmmuniseerd dier niet interfereert met het vermogen tot IgG synthese. Het is denkbaar dat in een dergelijke experimentele opzet een operationele definitie van de secundair reactie mogelijk is.

Experimenten

In een groep van 7 dieren, die 3-6 maanden tevoren met paratyfus vaccin waren geïmmuniseerd ($5 \cdot 10^8$ micro-organismen intraveneus), werd de milt bestraald (750 rad lokaal) na voorafgaande fixatie van dat orgaan aan de buikwand. Vijf dagen na deze bestraling werd paratyfus vaccin toegediend ($5 \cdot 10^8$ micro-organismen intraveneus).

In twee dieren werd 2 dagen na deze antigeen toediening de milt verwijderd, teneinde de bijdrage van dat orgaan tot de antilichaam-productie te kunnen vaststellen. Het titerverloop werd bepaald.

Resultaten

Toediening van paratyfus vaccin na een miltbestraling, leidde in een reeds eerder geïmmuniseerd dier (fig. 30), na een latentie tijd van 2-3 dagen, tot antilichaamproduktie. De gemiddelde 6e dags titer van de totale antilichaamproduktie bedroeg ongeveer 11 ($^2\log$ titer). Ook na de 6e dag vindt nog een zekere stijging van de titer plaats. Produktie van IgG antilichamen was in deze reeds eerder ge-

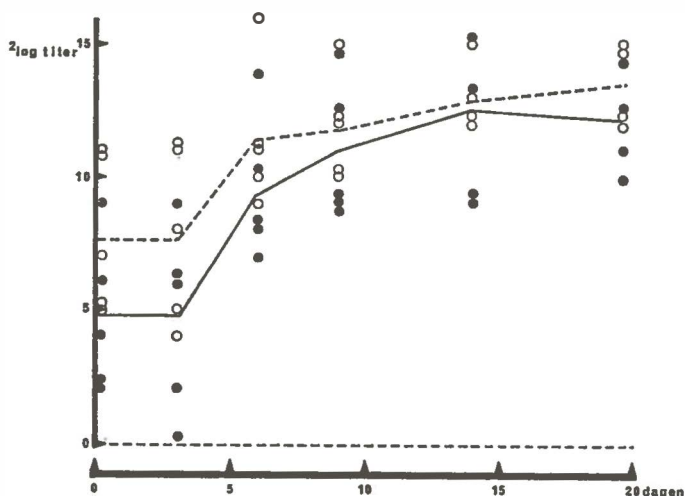


Fig. 30. Titerverloop van de H-agglutinenen na: Paratyfus toediening 5 dagen na een bestraling van de milt (750 rad). 6 Uur na deze immunisatie werd een dosis antilichaam toegediend. Deze dieren waren 2-3 maanden tevoren voor de eerste keer met paratyfus geïmmuniseerd.

immuniseerde dieren na miltbestraling reeds op de 3e dag waarneembaar. Wanneer de milt op de tweede dag na antigeentoediening totaal werd verwijderd, bleef echter de titerstijging doorgaan en werd op de zesde dag eveneens een titer van ± 11 bereikt. Ook de synthese van IgG antilichamen was onder deze omstandigheden aantoonbaar (fig. 31).

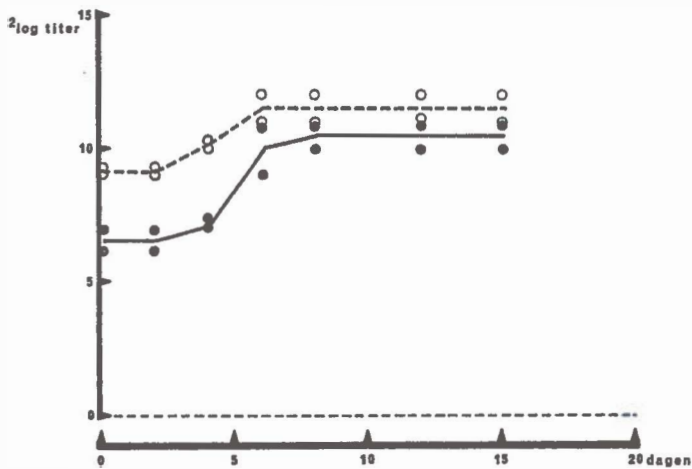


Fig. 31. Titerverloop van de H-agglutinininen in dieren die op dezelfde wijze werden behandeld als die welke in fig. 30 werden beschreven. 2 Dagen na de secundaire immunisatie werd splenectomie verricht.

Discussie

Bestraling van de milt beïnvloedt het titer verloop na toediening van paratyfus (gevolgd door een passieve immunisatie) niet, wanneer het dier reeds eerder met dat antigeen in contact is geweest. Onder dezelfde omstandigheden vindt in een niet eerder geïmmuniseerd dier gedurende ± 14 dagen geen IgG synthese plaats. Blijkbaar is de IgG produktie die in die periode optreedt in een opnieuw gestimuleerd dier, het gevolg van een verandering in de samenstelling van de groep immunocompetente cellen die tijdens de primaire reactie is opgetreden.

Een controle-experiment, waarin de milt werd verwijderd, wees uit, dat de secundaire reactie na een lokale miltbestraling voor tenminste 50 % buiten de milt plaats vindt. Blijkbaar zijn er buiten de milt memory-cellen aanwezig, die door deze immunisatie kunnen worden aangesproken. De aanwezigheid van memory-cellen in de periferie na een intraveneuze primaire immunisatie kan op twee manieren worden verklaard. In de eerste plaats is het denkbaar dat het antigeen buiten de milt memory-vorming induceert. Het lijkt echter onwaarschijnlijk dat een dergelijke memory-produktie kwantitatief tenminste even groot zou zijn als de memory-produktie in

de milt. Waarschijnlijker is, dat een aantal memory-cellen na hun ontstaan in de milt, dat orgaan verlaten hebben, om zich in de periferie te vestigen.

Het is denkbaar dat dit proces: produktie in een follikelcentrum, distributie als lymfocyt via de bloedbaan en tenslotte opslag als relatief immobiele follikelrandcel, een karakteristiek is voor alle B-cellen.

Enige aanwijzingen voor het vermoeden dat memory-cellen na hun produktie immobiel worden, zouden kunnen worden verkregen door lang na de primaire reaktie de milt lokaal te bestralen, en vervolgens de periferie te bestralen met bescherming van de milt.

Waarop de stimuleerbaarheid van de memory-cellen buiten de milt berust is niet duidelijk. Wel is het duidelijk dat het optreden van IgG synthese gedurende de eerste 14 dagen na een lokale bestraling van de milt een operationele definiëring van de secundaire reaktie vormt.

De waarnemingen bij de experimenten waarin bestraling van de milt werd gevolgd door een immunisatieprocedure waarbij ook antilichaam werd toegediend, suggereren nog een tweede verschil tussen de secundaire en primaire reaktie, dat zich mogelijk zou kunnen lenen voor een operationele definitie van de secundaire reaktie. Eén van de controle-experimenten (fig. 25) toonde hierbij aan, dat de belemmering van de eerste fase van de IgG synthese na een milt-bestraling in een niet geïmmuniseerd dier voor een deel werd veroorzaakt door de toegepaste passieve immunisatie (6 uur na antigeen-toediening). In een secundaire reaktie leidt dezelfde passieve immunisatieperiode niet tot een geringere IgG synthese (fig. 29 resp. fig. 30). Dat is ook niet te verwachten, daar in deze situatie nog een aanzienlijke concentratie autoloog geproduceerd antilichaam uit de primaire reaktie aanwezig is. Hieruit zou men kunnen konkluderen dat de primaire reaktie sterker beïnvloedt wordt door het toedienen van een specifiek antiserum dan de secundaire reaktie. Dit stemt overeen met de waarnemingen van UHR en BAUMANN (1961), die een volledige suppressie van de primaire, maar niet van de secundaire reaktie tegen difterietoxoid vonden na toediening van antitoxine. Ook de reakties tegen andere antigenen worden op soortgelijke wijze beïnvloed. (NEIDERS c.s. 1962, MORRIS en MÖLLER 1968). In bepaalde situaties

bleek overigens ook de secundaire reactie door passief verworven antilichaam worden belemmerd (HAMAOKA c.s. 1971).

Een maximaal effect op de primaire reactie wordt i.h.a. bereikt door antilichaam te geven enige tijd voor het antigeen toegediend wordt (FINKELSTEIN en UHR 1964, MÖLLER en WIGZELL 1965). In onze experimenten werd nog een onderdrukking van de eerste fase van de IgG synthese in de primaire reactie gevonden, wanneer antilichaam werd gegeven 6 uur na de actieve immunisatie (fig. 25). WIGZELL (1966) beschrijft zelfs een afname van het aantal antilichaamvormende cellen na een passieve immunisatie die 20 dagen na de antigeentoediening werd gegeven.

Het grote aantal aanwijzingen, dat circulerende antilichamen de primaire reactie wel, maar de secundaire reactie niet onderdrukken suggereert dus, dat ook het effect van passieve immunisatie op het titerverloop een operationele definitie van de secundaire reactie mogelijk maakt. In een aantal experimenten werd deze hypothese getest.

Experimenten

In vroegere, niet gepubliceerde, experimenten werd een volledige suppressie van de primaire reactie tegen paratyfusvaccin gevonden, door een passieve immunisatie 24-48 uur voor de antigeentoediening. In de hier beschreven experimenten werd een vergelijkbare immunisatieprocedure gevolgd, de gebruikte paratyfus-suspensie was echter een andere. Vierentwintig uur voor de toediening van paratyfusvaccin ($5 \cdot 10^8$ micro-organismen i.v.) werd eveneens intraveneus een dosis antiserum toegediend, leidend tot een titer van $\pm 3-4$. Dezelfde immunisatieprocedure werd gevolgd in een groep dieren die 3-6 maanden tevoren een primaire reactie (tegen paratyfusvaccin, $5 \cdot 10^8$ m.o.i.v.) hadden ondergaan.

Resultaten

De mercapto-ethanol gevoelige antilichaamproductie in de primaire reactie, die opgewekt werd na voorafgaande passieve immunisatie, bereikte op de 6e dag een titer van ± 8 ($^2\log$ titer). Dat is een faktor 2^3 lager dan na een actieve immunisatie alleen. IgG productie

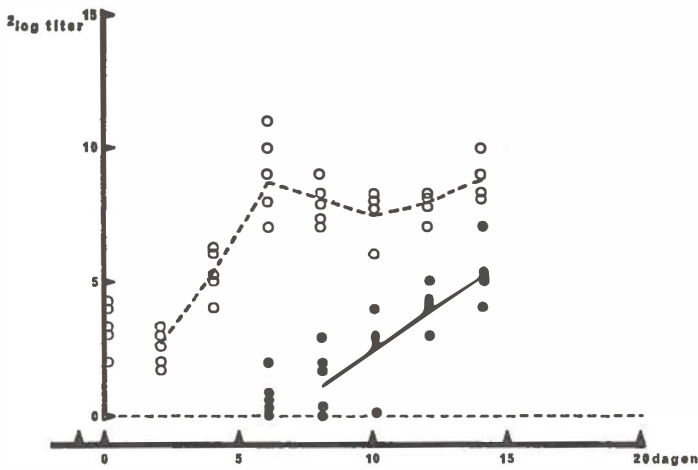


Fig. 32. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfus 24 uur na passieve immunisatie.

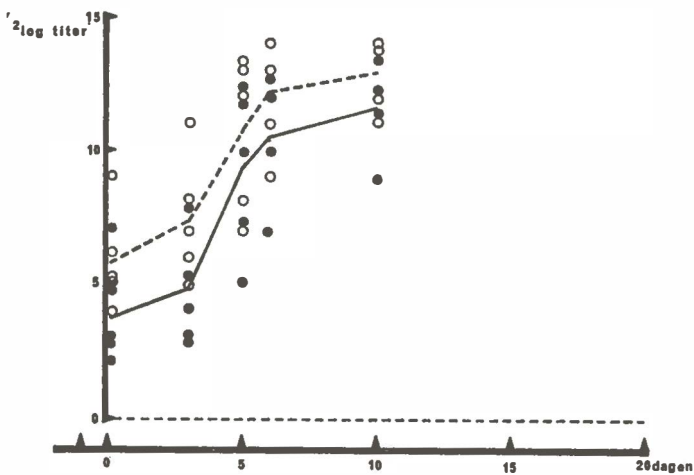


Fig. 33. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfuvaccin 24 uur na passieve immunisatie van dieren die 3-6 maanden tevoren een primaire reactie hadden ondergaan.

is pas vanaf \pm de 8e dag waarneembaar (fig. 32). Na dezelfde immunisatieprocedure in een tevoren geïmmuniseerd dier (fig. 33) was IgG synthese vanaf de 3e dag waarneembaar. Het titerverloop lijkt in dit geval niet af te wijken van het titerverloop na actieve immunisatie alleen (fig. 30).

Discussie

De waarneming dat passieve immunisatie de IgG produktie in de primaire reaktie enige tijd onmogelijk maakt, terwijl dezelfde procedure de IgG synthese in de secundaire reaktie niet belemmert, betekent dat het titerverloop na passieve immunisatie een operationele definitie van de secundaire reaktie lijkt op te leveren.

Het verschil in gevoeligheid van de primaire en van de secundaire reaktie voor een passieve immunisatie kan op een aantal factoren berusten. In beide reakties wordt het titerverloop primair bepaald door drie factoren: antigeen, immunocompetente cellen en antilichaamvormende cellen. Het grote aantal onderzoeken, dat verricht is met betrekking tot de effecten van passieve immunisatie, maakt het mogelijk het effect op elk van deze factoren te evalueren.

Antilichaamvormende cellen

Wat de antilichaamvormende cellen betreft, spelen 2 factoren een rol bij het bereiken van een bepaalde antilichaamconcentratie in het serum, nl. de produktie per cel - en de toename daarvan - en de exponentiële toename van het aantal cellen. In onze experimenten (fig. 25) verliep de stijging van de IgM titer na toediening van antilichaam even snel als zonder toediening van antilichamen. Dit wijst erop dat noch de proliferatie, noch de toename van de produktie per cel beïnvloed wordt door circulerend antilichaam. Theoretisch is het denkbaar, dat een vertraging van de ene faktor gecompenseerd zou worden door een toename van de andere. Dit is echter onwaarschijnlijk: experimenten van FELDMAN en DIENER (1970) toonden aan, dat de proliferatiesnelheid van antilichaamvormende cellen niet verandert door toediening van antilichamen. De „regulatie” van de antilichaamproduktie door passief antilichaam lijkt zich derhalve niet af te spelen op het niveau van de antilichaamvormende cel.

Immunocompetente cellen

Een aantal waarnemingen suggereert dat antilichamen direkt invloed zouden kunnen hebben op immunocompetente cellen NEIDERS c.s. (1962) en ROWLEY en FITCH (1964) beschreven de inductie van „tolerantie” door antilichaam dat toegediend werd vóór de immuni-

satie. Ook in een kwantitatieve analyse van FELDMAN en DIENER (1970) bleek een dergelijk effect aantoonbaar, doch alleen bij zeer bepaalde verhoudingen tussen antigeen- en antilichaamconcentratie. Het is niet aannemelijk dat in onze experimenten steeds een dergelijke verhouding wordt getroffen. Ook de afname van het aantal door het antigeen induceerbare immunocompetente cellen is dus waarschijnlijk niet verantwoordelijk voor de gevonden immuno-suppressie.

Antigeen

Na toediening van een gemerkt menselijk albumine aan het konijn bleek aanvankelijk een langzame afname van de concentratie van dit antigeen op te treden. Vanaf het ogenblik dat antilichaamproductie waarneembaar werd, vond een snelle concentratiedaling plaats, terwijl tevens de aanwezigheid van antigeen- antilichaamcomplexen vast te stellen was (SCHWARTZ c.s. 1959). Blijkbaar resulteert de aanwezigheid van actief geproduceerd antilichaam in een versnelde - immuun - eliminatie van het antigeen. Waarschijnlijk leidt ook passieve immunisatie tot een dergelijk proces. Het is dus mogelijk, dat de belemmering van de primaire reactie na passieve immunisatie wordt veroorzaakt door een absoluut tekort aan antigeen, tengevolge van de immuuneliminatie.

Het is echter niet waarschijnlijk dat immuuneliminatie de enige manier is waarop een antilichaam de inductie beïnvloedt. Antilichaamtoediening 24 uur voor de immunisatie onderdrukt namelijk de IgM synthese en de tweede fase van de IgG synthese in de primaire reactie in geringe mate, de eerste fase van de IgG productie volledig, en de secundaire reactie niet. Vermoedelijk vormen de circulerende antilichamen ook voor de inducerende werking van het niet geëlimineerde antigeen nog een belemmering: Een groot aantal waarnemingen heeft het namelijk mogelijk gemaakt de receptoren voor het antigeen op het celgrensvlak te identificeren als antilichaamfragmenten. De eerste aanwijzingen hiervoor werden gevonden door SELL en GELL (1965), die de transformatie van lymfocyten tot blasten, na stimulering met anti-immuunglobuline of anti-allotype antilichamen, beschreven. Nadere aanwijzingen werden verkregen door de eliminatie van lymfocyten in met antigeen bedekte kolom-

men (WIGZELL en ANDERSSON 1969) en door de inaktivering door gelabelde antigenen (BYRT en ADA 1969, ADA en BYRT 1969). Uit de experimenten waarin rozetvorming (COOMBS c.s. 1969, 1970), dan wel fluorescentie en- of autoradiografie (RAFF c.s. 1970, RABELLINO c.s. 1971) werd bepaald na incubatie van lymfocyten met anti-immuunglobuline, anti-H- en anti-L keten sera, kon worden gekonkludeerd dat een groot aantal cellen in bloed, milt en lymfklieren immuunglobulinefragmenten, met γ , μ , of α ketens, aan hun oppervlak hebben. In bovengenoemde onderzoeken werd aan het oppervlak van thymocyten geen immuunglobuline gevonden, doch GREAVES en HOGG (1971) beschrijven de aanwezigheid van een μ keten op cellen, die mogelijk uit de thymus afkomstig zijn. Algemeen wordt aangenomen dat de receptor op de B-cel overeenkomt met de bindingsgroep van het antilichaam dat die cel na induktie gaat maken.

De kwaliteit van de binding tussen antigeen en zowel het celgebonden, als het vrij circulerende, antilichaam, wordt bepaald door de waarde van de bindingskonstante in de evenwichtsreactie tussen antigeen en antilichaam. Deze waarde, de affiniteit, is karakteristiek voor het antilichaam. Binnen een groep antilichamen die gevormd zijn tegen één hapteen, bestaat i.h.a. een sterke spreiding van de affiniteit voor dat hapteen. EISEN en SISKIND (1964) vonden na een éénmalige immunisatie een affiniteitsvariatie van een faktor 10^4 . In het verloop van de reactie blijkt de gemiddelde affiniteit hoger te worden (EISEN en SISKIND 1964, SISKIND c.s. 1968). Blijkbaar worden van het oorspronkelijke brede spectrum aan affiniteiten op den duur alleen nog de hoge gevormd.

Nu bleek dat het vermogen tot suppressie van de primaire reactie door hyperimmuunsera uit het eind van de reactie veel groter is dan dat van antisera uit het begin (DIXON 1967, UHR en MÖLLER 1968). Dit suppressievermogen bleek inderdaad samen te hangen met de affiniteit (WALKER en SISKIND 1968). De receptor antilichamen van de cellen voor de primaire reactie hebben een gemiddeld lage affiniteit. Men mag aannemen dat tussen een hoog-affien circulerend antilichaam, en een laag affien celgebonden antilichaam competitie om het antigeen zal optreden. Wanneer de hoeveelheid antigeen beperkt is, zal deze competitie uitvallen ten gunste van het antilichaam

met de hoogste affiniteit, zodat de competente cel voor de primaire reukie niet wordt geïnduceerd.

Een antilichaam met een bepaalde kwaliteit is gemaakt door een cel, die alleen antilichamen van diezelfde kwaliteit kan maken, zodat ook de receptor van die cel eenzelfde kwaliteit, zal hebben. Dit geldt waarschijnlijk ook voor de affiniteit van dat antilichaam, hoewel niet is aangetoond dat het produkt van één plasmacel steeds dezelfde affiniteit heeft. Een aanwijzing daarvoor vormt de waarneming dat globulinen uit een myeloom met anti-hapteen-aktiviteit één zelfde affiniteit hebben (EISEN c.s. 1968). De aanwezigheid láát in een immunisatieprocedure van antilichamen met een hoge affiniteit, wijst er dus op, dat er op dat moment cellen zijn met een hoge receptor-affiniteit. De aanwezigheid van - memory - cellen met een receptor van hoge affiniteit zou kunnen verklaren dat een secundaire reuktie door een voorafgaande passieve immunisatie nauwelijks of niet wordt belemmerd.

Ook in de primaire reuktie bleek echter nog antilichaamproduktie mogelijk, ondanks de passieve immunisatie (fig. 32). Dat gold met name voor de IgM produktie en voor de tweede fase van de IgG synthese. Wanneer de secundaire reuktie inderdaad ondanks de passieve immunisatie plaats vindt, ómdat er memory cellen met een hoge affiniteit bij betrokken zijn, ligt het voor de hand te veronderstellen dat ook bij de tweede fase voor de IgG synthese, cellen met een hoge affiniteit aanwezig zijn.

Het is denkbaar dat reeds in de groep immunocompetente cellen die vóór de antigeentodiening aanwezig is, een klein aantal cellen voorkomt met een relatief hoge affiniteit, en dat de langzame stijging van de IgG titer in de tweede fase het gevolg is van de vermenigvuldiging van plasmacellen die juist uit deze cellen zijn ontstaan. Dit proces wordt gesuggereerd door de exponentiële stijging van de titer in deze fase.

Een andere mogelijkheid is, dat in de loop van de primaire reuktie nieuwe immunocompetente cellen worden gevormd, die door nog aanwezig antigeen kunnen worden aangesproken. Uit een dergelijke groep zullen alleen die cellen worden aangesproken, die een hogere affiniteit bezitten dan het circulerende antilichaam. Men moet aannemen dat deze tweede situatie zich voordoet, daar alleen deze na-induktie stijging van de gemiddelde affiniteit van het

geproduceerde antilichaam kan verklaren. Daarnaast zijn er ook directe aanwijzingen voor een dergelijke na-inductie van cellen: WIGZELL (1966) vond nog een vermindering van het aantal antilichaamvormende cellen (bepaald m.b.v. de Jerne-techniek) wanneer 20 dagen na antigeentoediening passief werd geïmmuniseerd. Een stijging van de affiniteit van de antilichamen in de primaire reactie staat overigens niet geheel vast, daar de immunisatie in deze experimenten i.h.a. gebeurde in Freund's adjuvans. Wanneer eenzelfde affiniteitsstijging ook in een op „normale” wijze opgewekte primaire reactie optreedt, lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat de tweede fase van de IgG synthese wordt veroorzaakt door nieuwgevormde cellen, die worden geïnduceerd door het antigeen dat ook tot hun ontstaan aanleiding gaf. Een van de meest voor de hand liggende bronnen voor deze cellen lijkt de follikelcentrum reactie: dit is één van de weinig lokalisaties waar zo lang na de toediening nog antigeen aanwezig is, en waar nog productie van cellen optreedt. De overeenstemming in het titerverloop na passieve immunisatie en na miltbestraling suggereert verder, dat dezelfde cellen in beide gevallen verantwoordelijk zijn voor de tweede fase van de IgG synthese. Ook na miltbestraling kan de productie van deze cellen worden verklaard uit de activiteit van de in het bestraalde orgaan geïnduceerde follikelcentrum-reakties.

Wanneer echter de stijging van de affiniteit in de primaire reactie afhankelijk zou zijn van de toediening van het antigeen in Freund, en wanneer daarnaast de door WIGZELL (zie boven) beschreven na-inductie procentueel onbelangrijk zou zijn, moet men de mogelijkheid overwegen dat de cellen voor de eerste en voor de tweede fase van de IgG synthese identiek zijn. Het verschil in de kinetiek van deze fasen zou kunnen worden veroorzaakt door een „switch” proces: De stijging van de titer in de tweede fase zou kunnen worden verklaard uit een proliferatie van antilichaamvormende cellen. De snelle stijging in de eerste fase zou het gevolg kunnen zijn van een snelle differentiatie van dezelfde cellen, leidend tot een snelle toename van hun individuele productiecapaciteit.

Wanneer gedurende de primaire reactie immunocompetente cellen worden gevormd die, via een proces van na-inductie, verantwoordelijk zijn voor de tweede fase van de IgG synthese, dan zou men deze cellen kunnen beschouwen als „memorycellen”. Uit het titer-

verloop blijkt dat de antilichaamproduktie in deze cellen kwantitatief anders verloopt dan in de sekundaire reactie. Dit zou mogelijk een gevolg kunnen zijn van de wijze van inductie: Experimenten beschreven op blz. 82 suggereren dat voor de expressie van memomry in de vorm van een secundaire reactie de aanwezigheid van een T-memorycel vereist is.

Behalve de tweede fase van de IgG synthese verliep ook de IgM synthese in de primaire reactie na passieve immunisatie betrekkelijk normaal. Antilichaamtoediening 24 uur vóór de immunisatie leidde tot een geringe daling (faktor 2³) van de 6e dagstiter. Wanneer echter 6 uur na de immunisatie antilichaam werd gegeven, dan had dit geen effect meer op de IgM produktie (fig. 32, fig. 25). Hieruit kan worden geconcludeerd, dat het inductieproces van de IgM synthese in zijn geheel kort na de antigeentoeediening plaats vindt. Passieve immunisatie na die periode onderdrukt echter nog steeds de inductie van de eerste fase van de IgG synthese. Blijkbaar geschiedt de inductie van deze fase voor een belangrijk deel pas nadat de inductie van de IgM synthese reeds geheel is afgesloten. Tenslotte kan worden vastgesteld dat circulerend antilichaam de inductie van de IgM synthese slechts ten dele belemmert; ook wanneer 24 uur voor de antigeentoeediening passief werd geïmmuniseerd, bleek nog een groot aantal IgM cellen te worden aangesproken. Hiervoor kunnen een aantal verklaringen worden gegeven:

IgG en IgM synthese tegen paratyfusvaccin verschillen wat hun afhankelijkheid van T-cellen betreft. Het zou dus denkbaar zijn dat de grote gevoeligheid van de IgG synthese voor passieve immunisatie erop berust, dat antilichaam interfereert met het kontakt tussen antigeen en T-cel. Deze verklaring is echter om een aantal redenen onwaarschijnlijk. In de eerste plaats blijkt uit onze experimenten dat de eveneens thymus-afhankelijke IgG synthese in de tweede fase en in de secundaire reactie wel plaatsvindt ondanks passieve immunisatie. In de tweede plaats vonden KAPPLER c.s. (1971), dat passieve immunisatie tegen de carrier een effectief kontakt tussen T-helper-cel en carrier-hapteen antigeen niet onmogelijk maakte.

Het verschil in gevoeligheid van IgM en IgG synthese lijkt dus te moeten worden gezocht in de eigenschappen van de betrokken

B-cellen. Het is denkbaar dat de valentie van de receptor op een IgM competente cel groter is dan die op de IgG competente cel. In dit geval zou, ondanks een eventuele lagere affiniteit per bindingsgroep de resulterende bindingsneiging - de aviditeit - van een IgM receptor hoger kunnen zijn dan de aviditeit van de IgG receptor. De hoge aviditeit van de receptoren van de betrokken cellen kan verantwoordelijk zijn voor het geringe effect van passieve immunisatie op de IgM produktie. Zou een zelfde faktor een rol kunnen spelen bij de door KAPPLER (zie boven) beschreven ongevoeligheid van een T-cel-immunisatie voor voorafgaande passieve immunisatie? Waarschijnlijk bevat ook de T-cel op of in het celoppervlak een antilichaamfragment (GREAVES en HOGG 1971, LESLEY c.s. 1971). Wanneer de cel hierdoor een hoge aviditeit zou hebben, kan dit de relatieve ongevoeligheid voor passieve immunisatie verklaren. Overigens is het niet waarschijnlijk dat zelfs een niet avide T-cel van een passieve immunisatie, gericht tegen de „haptene” specificiteit van de carrier, concurrentie zou ondervinden: het carriereffect (zie pag. 8) toont aan dat in het carrier-hapteen model de B- en de T-cel uit een immunocompetente eenheid obligeert een verschillende specificiteit hebben. Het passief verkregen antilichaam heeft uiteraard de specificiteit van de B-cel - eventueel van de carrier B-cel - en niet van de T-cel.

Het ongestoorde verloop van de secundaire reactie na passieve immunisatie wijst op de aanwezigheid van een groot aantal cellen met hoge affiniteit. Dit grote aantal kan op drie manieren zijn ontstaan: De eerste mogelijkheid is, dat er een selektieve proliferatie van bestaande B-cellen met een hoge affiniteit plaats vindt. De tweede mogelijkheid is, dat alle aanwezige affiniteiten worden vermenigvuldigd, maar dat de tweede antigeentoediening alleen cellen met een hoge affiniteit aanspreekt, als gevolg van de competitie met het circulerende antilichaam. De derde mogelijkheid is, dat er een totaal nieuwe groep cellen ontstaat, met tevoren niet bestaande of manifeste eigenschappen.

Of memoryvorming de creatie van nieuwe cellen, of de proliferatie - met of zonder selektie - van reeds bestaande cellen inhoudt, is vooralsnog niet duidelijk. Wanneer geen kwalitatieve verschillen tussen „memorycellen” en „virginale cellen” kunnen worden aangetoond,

is er geen aanleiding om de ingewikkelde weg van de creatie te kiezen.

Naar aanleiding van de eerder in dit hoofdstuk weergegeven experimenten werden twee experimentele methoden beschreven, volgens welke de secundaire reactie operationeel te definiëren is. Zowel na een lokale bestraling van de milt, als na een passieve immunisatie, blijft de IgG produktie enige tijd achterwege, wanneer geen memory is opgebouwd. Aanwezigheid van IgG produktie onder deze omstandigheden en in die periode zullen we in de volgende experimenten beschouwen als het bewijs dat memory is opgebouwd. Waarschijnlijk wordt in beide operationele definities een eigenschap van de B-cel gebruikt; dat geldt zeker voor de affiniteit van de memorycel. Het is mogelijk, dat een secundaire reactie na een lokale miltbestraling daarnaast mogelijk wordt gemaakt door het bestaan van een mobiele cel. Een dergelijke cel zou behalve in de B-cel groep ook goed passen bij de T-cellen.

In de hierna volgende experimenten wordt de rol geanalyseerd die T- en B-cellen hebben bij de memory vorming en bij de secundaire reactie.

Hoofdstuk V.

CELINTERAKTIE IN MEMORY VORMING EN SECUNDAIRE REAKTIE

Bij een aantal processen die zich tijdens de primaire reactie afspelen zijn zowel T- als B-cellen betrokken. Of ook de memoryvorming tot deze processen behoort, is niet bekend. We hebben daarom geprobeerd deze vraag in een aantal experimenten te beantwoorden.

In principe lijkt „memoryvorming”, dat is: de door het antigeen geïnduceerde proliferatie van cellen met een bij dat antigeen passende specificiteit, zowel in de T- als in de B-cellen populatie mogelijk. In beide celgroepen treedt immers proliferatie op, en in beide celgroepen is specificiteit aantoonbaar.

Wanneer we aannemen dat memory een eigenschap kan zijn van T-cellen, en daarvoor zijn directe aanwijzingen te vinden in het effect van een anti-theta-serum op een geïmmuniseerde cel-populatie (RAFF 1970, TAKAHASHI c.s. 1970, MILLER en SPRENT 1971), lijken de experimenten van MITCHISON (1971a, b, c) aan te tonen, dat deze memory opgebouwd wordt, zonder dat er B-cellen aanwezig behoeven te zijn. In deze experimenten werd namelijk een carrier-antigeen aangeboden aan een letaal bestraalde muis, die met thymocyten was gesubstitueerd. Onder deze omstandigheden werden voor de carrier specifieke T-memorycellen gevormd, die een volgende receptor, die met een hapteen aan een andere carrier was geïmmuniseerd, in staat stelden tot een secundaire reactie tegen de combinatie van hapteen en de eerste carrier.

Er zijn voorlopig geen directe aanwijzingen voor het bestaan van memory in de B-cel groep, maar wanneer deze bestaat, rijst het probleem, of deze memoryproductie plaats vindt zonder dat er van koöperatie met een T-cel sprake is. THORBECKE (zie blz. 13) vond aanwijzingen, dat de vorming van memory gekorreleerd is met het

verloop van de follikelcentrumreactie. WAKSMAN c.s. (1962) en VELDMAN (1970) beschreven het voorkomen van deze reactie in T-celloze dieren. Wanneer er inderdaad B-memorycellen bestaan lijkt het dus niet uitgesloten dat de vorming van deze cellen plaats vindt zonder interactie met T-cellen. Om deze hypothese te toetsen hebben we aan „in vivo geïsoleerde” T- of B-celgroepen antigeen aangeboden, en daarna beide celgroepen gecombineerd, onder condities waarin de eventueel gevormde memory tot expressie zou kunnen komen.

B-cellen zijn „in vivo geïsoleerd” aanwezig in dieren die na thymectomie drie keer totaal worden bestraald (450 rad) zie fig. 3. T-cellen zijn korte tijd „geïsoleerd” aanwezig in drie keer bestraalde dieren, die tijdens de bestraling bescherming van de thymus ontvingen (VELDMAN 1970) zie fig. 3. Wanneer „memoryvorming” niet van koöperatie afhankelijk is, zou antigeen toediening aan de T-celloze dieren kunnen leiden tot de vorming van B-memorycellen. T-memorycellen zouden kunnen ontstaan na antigeentoediening, kort na de laatste bestraling met thymus bescherming. Een combinatie van beide celsoorten zou tot een secundaire reactie in staat moeten zijn.

Experimenten

Een groep van 10 dieren werd drie keer bestraald (450 rad) met bescherming van de thymusregio, zie fig. 3. 48 Uur na de laatste bestraling werd paratyfusvaccin in een totale dosering van $6 \cdot 10^8$ m.o. toegediend, verdeeld in gelijke hoeveelheden, die resp. i.v. en s.c. interscapulair en in beide achterpoten werden gegeven. 24 Uur na deze immunisatie werd intraveneus een dosis hyperimmuun-anti-paratyfusserum toegediend, resulterend in een passieve titer van ± 2 . De bedoeling van deze passieve immunisatie was een immuun-eliminatie van het antigeen te verkrijgen, voordat regeneratie van het B-cellsysteem zou optreden. Als controle op de effectiviteit van deze eliminatie werd het titerverloop gedurende de eerste 14 dagen na antigeentoediening gevolgd (fig. 35).

4 Weken na deze immunisatie werd bij 8 dieren uit deze groep de linker popliteale lymfeklier geëxtirpeerd. Van deze lymfeklieren tezamen werd een celsuspensie gemaakt, die uiteindelijk voor 80 % uit levende cellen bestond. Deze suspensie werd toegediend aan

4 receptoren, waarbij elk dier $2 \cdot 10^7$ levende cellen ontving. De receptoren waren gethymectomeerde, 3 keer bestraalde konijnen, die 12 weken na de laatste bestraling met paratyfusvaccin (6×10^7 m.o.) waren geïmmuniseerd, op dezelfde manier als boven werd beschreven. 4 Weken na deze immunisatie werd een dosis hyperimmuun serum toegediend, leidend tot een passieve titer van ± 3 . 24 Uur na deze passieve immunisatie werd de bovenbeschreven celsuspensie intraveneus toegediend. Onmiddellijk na de transfer werd paratyfusvaccin ($6 \cdot 10^7$ micro-organismen intraveneus) gegeven.

Daar het hier een allogene cellenkombinatie betreft, hebben we in een controle-experiment het effect van een dergelijke allogene combinatie op het titerverloop bepaald. Hiertoe werd een lymfklier-celsuspensie van een normaal en niet geïmmuniseerd dier, intraveneus toegediend aan een eveneens normale, niet geïmmuniseerde receptor. 24 Uur voor de transfer ontving de receptor antiserum (passieve titer ± 2). Onmiddellijk na de transfer werd geïmmuniseerd met paratyfusvaccin: $6 \cdot 10^7$ micro-organismen intraveneus.

Resultaten

- Allogene cellenkombinatie in ongeïmmuniseerde receptoren.
In dit controle-experiment bleek de IgM produktie op de 6e dag een waarde van ± 7 ($^2\log$ titer) te bereiken. Gedurende de eerste 10 dagen is geen IgG synthese waarneembaar (fig. 34).
- Antilichaamproduktie door geïsoleerde T-cellen?
Immunisatie 48 uur na de laatste van drie bestralingen uitgevoerd met thymusbescherming, leidde niet tot een waarneembare antilichaamproduktie. Het titerverloop in fig. 35 toont de afname van de passieve titer in deze dieren die later als lymfklierdonoren zouden fungeren.
- Titerverloop in de geïmmuniseerde receptoren na transfer van de lymfklier-celsuspensie uit de boven beschreven dieren.
4 Dagen na antigeentoediening is de aanwezigheid van IgG antilichamen in het serum meetbaar. Gedurende de eerste dagen treedt een duidelijk waarneembare stijging van de IgG antilichaamtiter op (fig. 36).

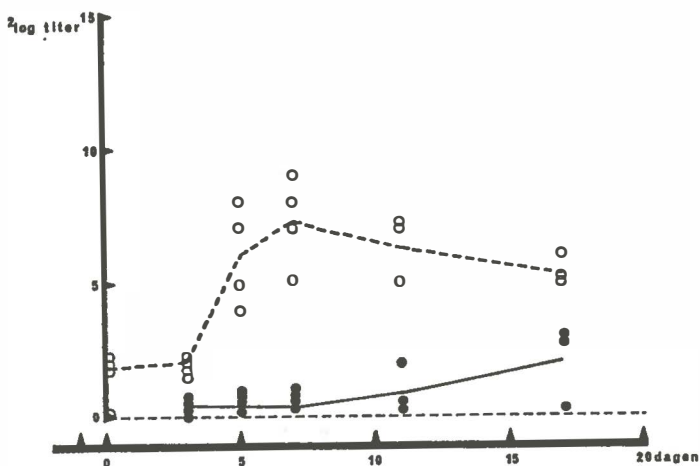


Fig. 34. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin 24 uur na passieve immunisatie. Tegelijk met het antigeen ontvingen deze dieren een ongeïmmuniseerde lymfklierfelsuspensie intraveneus.

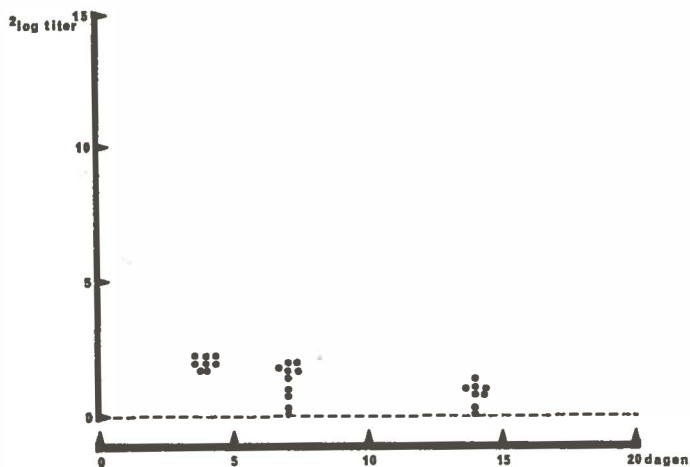


Fig. 35. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin 48 uur na de laatste van drie totale lichaamsbestralingen uitgevoerd met thymus bescherming. 24 Uur na deze immunisatie werd een dosis antilichaam gegeven.

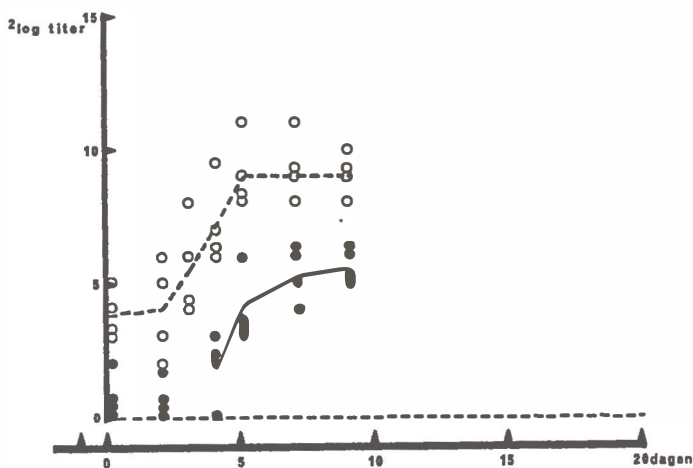


Fig. 36. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin aan gethymectomeerde bestraalde dieren die 8 weken na de laatste bestraling een primaire reactie hadden ondergaan. Tegelijk met deze tweede immunisatie werd een lymfklier cel suspensie toegediend van dieren die met paratyfus waren geïmmuniseerd 48 uur na de laatste van 3 bestralingen uitgevoerd met thymus bescherming.

Discussie

Antigeen toediening aan een virginaal dier na passieve immunisatie leidde gedurende 8-10 dagen niet tot waarneembare IgG productie. In een T-celloze receptor van lymfklier cellen uit een donor die geïmmuniseerd werd terwijl er alleen T-cellen aanwezig waren, is in die periode onder dezelfde omstandigheden wel IgG productie mogelijk. Deze waarneming zou er op kunnen wijzen dat in deze receptoren expressie van memory plaats vindt.

De celtransfer die in deze experimenten werd gebruikt, leidt echter tot een allogene combinatie van cellen. Nu is het in de eerste plaats niet duidelijk of een dergelijke combinatie tot koöperatie in staat is. In de muis is dat wel het geval: MILLER en MITCHELL (1968) vonden geen verschil tussen het vermogen van isologe, allogene of semi-allogene ductus thoracicus cellen om neonataal gethymectomeerde muizen te reconstitueren wat hun reactievermogen tegen schapen-erythrocyten betreft. Ook in konijnen lijkt een allogene combinatie tot koöperatie in staat; VELDMAN (1970) beschreef het optreden van

een plasmacellulaire reactie in een T-celloos konijn, na toediening van een allogene combinatie van thymocyten (!).

In de tweede plaats vonden ЕКПАНА-MENSAH en KENNEDY (1971) aanwijzingen dat tussen cellen van donoren en receptoren, die verschillen in één van de belangrijkste histo-compatibiliteitsfactoren een synergisme kan optreden, dat ten onrechte geïnterpreteerd kan worden als een uiting van een specifieke T-B-cel koöperatie. Zij suggereren dat, als gevolg van de specifiek-cellulaire reactie tussen de betrokken cellen mitogene factoren vrij komen, die op geheel aspecifieke wijze de T-helper-celfunctie kunnen overnemen. Dit zou kunnen betekenen, dat de door ons waargenomen IgG synthese (fig. 36) niet een expressie van opgebouwde memory is, maar een aspecifieke stimulering van de B-cellen door de geïnduceerde graft-versus-host reactie. Specifieke koöperatie lijkt echter ook tussen allogene celcombinaties wel mogelijk: Een secundaire reactie tegen een hapteen dat gekoppeld is aan een bepaalde carrier is mogelijk, door het voor het hapteen geïmmuniseerde dier allogene of semi-allogene T-cellen aan te bieden. Dit berust niet op het aspecifieke effect van een graft-versus-host reactie, want het is alleen mogelijk wanneer deze T-cellen met de carrier geïmmuniseerd zijn (MITCHISON 1971a, b, c.). Ook de genoemde experimenten van VELDMAN (zie boven) wijzen op een specifieke interactie tussen allogene cellencombinaties: Een T-celloos konijn reageerde op een T-cellensuspensie met een plasmacellulaire reactie, doch alleen dan, wanneer de T-cellen (thymocyten) van verschillende donoren afkomstig waren. Dit ondanks het feit, dat de thymocyten van elk van de donoren voor zich, ook tot een graft-versus-host reactie aanleiding zullen hebben gegeven. Ook in dit geval lijkt eventueel naast een aspecifieke stimulering zeker ook een specifieke koöperatie aanwezig te zijn.

In het controle experiment (fig. 34) bleek geen waarneembare stimulering van de antilichaamvorming in de receptor op te treden na toediening van een (allogene) lymfklier-celsuspensie. In onze experimenten lijkt derhalve deze aspecifieke stimulering geen rol te spelen. De IgG synthese in een geïmmuniseerde T-celloze receptor die „geïmmuniseerde T-cellen” toegediend kreeg, moet derhalve het gevolg zijn van de expressie van memory. Deze memory is opgebouwd, zonder dat er van een koöperatie tussen T- en B-cellen sprake

heeft kunnen zijn. De boven beschreven experimenten maken niet duidelijk in welke celpopulaties deze memory is opgebouwd.

Indien memory voorkomt in T-cellen, is voor expressie van die memory als antilichaamvorming, koöperatie met een B-cel nodig. T-cellen zijn immers zelf niet in staat tot antilichaamproductie (fig. 35). Als memory uitsluitend een eigenschap is van T-cellen, dan zou de samenwerking met een virginale B-cel volstaan om een „secundaire reactie” mogelijk te maken. Onder welke experimentele omstandigheden zou nu een dergelijke T-cel-memory aantoonbaar zijn? Daar T-cellen mobiel zijn, belooft het experimentele systeem, waarin door een lokale bestraling mogelijk juist de mobiliteit van de memory cellen tot uitdrukking komt, optimale condities voor het aantonen van een T-memory-cel.

Het experimentele systeem van de tweede operationele definitie is voor het aantonen van memory uitsluitend in de T-cel populatie minder geschikt, daar de in dit systeem gebruikte passieve immunisatie de inductie van virginale B-cellen van lage affiniteit onmogelijk maakt. Het is daarom denkbaar, dat in dit experimentele systeem geen expressie van een T-memorycel optreedt, en na een lokale bestraling wel. Het effect van interactie tussen een - hypothetische - T-memorycel en een virginale B-cel hebben we daarom in beide systemen bepaald.

Experimenten

De groep van 10 dieren, die 24 uur na de laatste van drie bestralingen, uitgevoerd met bescherming van de thymus, werden geïmmuniseerd en die daarna fungeerden als donoren van „geïmmuniseerde T-cellen” (fig. 35), werd opnieuw gebruikt voor deze experimenten. Vijf weken na deze eerste immunisatie werd bij 5 dieren lokale bestraling van de milt uitgevoerd (750 rad), vijf dagen later werd geïmmuniseerd met paratyfusvaccin ($6 \cdot 10^7$ micro-organismen intraveneus), na 6 uur gevolgd door toediening van antiserum. De 5 andere dieren ontvingen terzelfder tijd een passieve immunisatie (tot een titer ± 3), na 24 uur gevolgd door paratyfusvaccin, $6 \cdot 10^7$ micro-organismen, intraveneus.

Deze immunisatieprocedures komen overeen met die, welke werden toegepast in virginale dieren, eveneens na miltbestraling (fig. 24)

resp. passieve immunisatie (fig. 32). Deze laatste experimenten dienden als controle voor de hier beschreven experimenten.

Resultaten

- antigeentoediening na miltbestraling in een dier met „geïmmuniseerde T-cellen” (fig. 37).

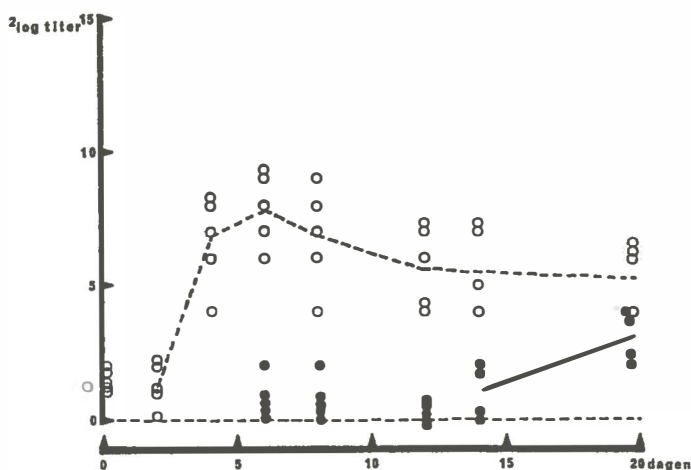


Fig. 37. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfuvaccin aan dieren die 5 dagen tevoren een lokale bestraling van de milt hadden ondergaan. Deze dieren waren voor de eerste keer geïmmuniseerd met paratyfus 48 uur na de laatste van 3 bestralingen uitgevoerd met thymusbescherming.

De IgM-synthese bereikte in deze dieren een titer van ± 8 ; IgG-produktie was vanaf de 14e dag waarneembaar, en leek dan te verlopen volgens het patroon van de „tweede fase” van de IgG synthese. Zowel het IgM als het IgG titerverloop leken in deze dieren volledig overeen te komen met het titerverloop in virginale dieren gedurende de primaire reactie na een lokale bestraling (verg. fig. 24).

- antigeentoediening na passieve immunisatie van dieren met „geïmmuniseerde T-cellen”.

De IgM produktie in deze dieren bereikte op de 6e dag een piektiter van 7-8. IgG synthese was in 4 van de 5 dieren pas waarneembaar op de 20e dag (fig. 38).

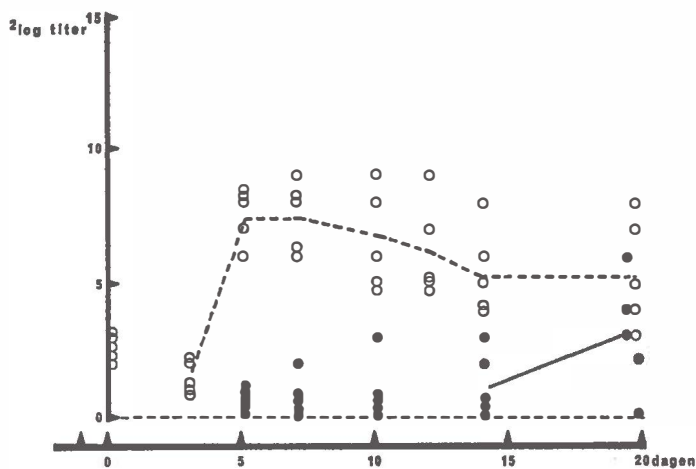


Fig. 38. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin aan dieren die 24 uur tevoren passief waren geïmmuniseerd. Deze dieren waren voor de eerste keer geïmmuniseerd 48 uur na de laatste van 3 bestralingen uitgevoerd met thymus bescherming.

Discussie

Het uitblijven van een „secundaire reactie” in deze twee experimenten, en de aanwezigheid van die reactie in de substitutie-experimenten (fig. 36), dwingt tot de konklusie dat er B-memory-cellen bestaan. Het uitblijven van een secundaire reactie in de hier beschreven experimenten kan namelijk op twee oorzaken berusten:

De eerste mogelijkheid is, dat immunisatie van een dier, 24 uur na de laatste van een serie van drie totale bestralingen met thymus bescherming, *niet* leidt tot de vorming van T-memory-cellen, ofwel omdat dergelijke cellen niet bestaan, ofwel omdat de experimentele omstandigheden hun vorming onmogelijk maakten. In beide gevallen is de waargenomen secundaire reactie van de T-celloze maar gereconstitueerde receptor (fig. 36) veroorzaakt door de aanwezigheid van B-memorycellen in die receptor.

De tweede mogelijkheid is, dat immunisatie van geïsoleerde T-cellen wel tot de vorming van memory in die groep leidt, maar dat deze cellen niet in staat zijn een virginal B-cel te induceren tot een secundaire reactie. Ook deze mogelijkheid leidt derhalve tot de kon-

klusie dat er B-memorycellen bestaan, en dat die cellen voor een secundaire reactie nodig zijn.

De waarneming dat „geïmmuniseerde” T-cellen geen aanleiding geven tot het optreden van een secundaire reactie na passieve immunisatie of miltbestraling, leidt verder tot de konklusie, dat de operationele definities van de secundaire reactie, zoals beschreven in hfdst. IV, berusten op eigenschappen van de B-cel. Is deze B-memorycel in staat om zonder „hulp” van een T-cel een secundaire reactie uit te voeren? Om deze vraag te kunnen beantwoorden werd een groep T-celloze dieren, die reeds een primaire reactie hadden ondergaan, opnieuw geïmmuniseerd.

Experimenten

De groep gethymectomeerde, drie keer bestraalde dieren, die resp. 4, 6, of 16 weken na de laatste bestraling antigeen ontvingen, en waarvan het titer-verloop na die antigeentoediening is beschreven in fig 8, kreeg 4 weken na de eerste immunisatie opnieuw paratyfusvaccin toegediend ($6 \cdot 10^7$ micro-organismen intraveneus). Uit een „pilot”-experiment bleek, dat slechts zeer weinig IgG zou worden geproduceerd onder deze kondities. Daar na passieve immunisatie, resp. miltbestraling ook deze geringe produktie niet waarneembaar zou zijn, werd van deze procedures afgezien.

In een controlegroep werd geprobeerd vast te stellen in hoeverre de herhaalde bestraling, en niet het tekort aan T-cellen, voor het verwachte uitblijven van een secundaire reactie verantwoordelijk was. Een groep dieren onderging 8 weken na een herhaalde totale bestraling met thymusbescherming een primaire immunisatie, ($6 \cdot 10^7$ m.o. verdeeld over de reeds eerder genoemde injectieplaatsen); 12 weken na de laatste bestraling werd opnieuw paratyfusvaccin toegediend ($6 \cdot 10^7$ m.o. intraveneus), nadat - pro forma - 24 uur tevoren passief was geïmmuniseerd. In beide groepen werd het titer-verloop bepaald.

Resultaten

— T-celloze dieren.

De IgM produktie na restimulering van T-celloze dieren bereikt een maximale titer van 10-11.

Vanaf de 10e dag is in een aantal dieren IgG synthese waarneembaar, de titer die bereikt wordt, is echter gering; na ± 3 weken is in 4 van de 5 dieren die dan nog in leven zijn IgG aantoonbaar (fig. 39).

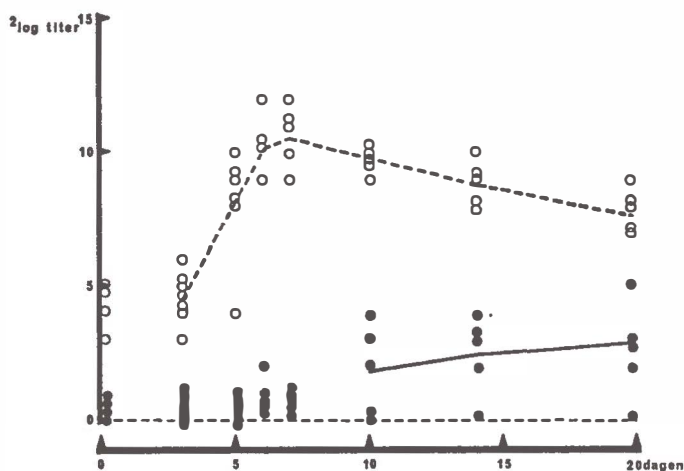


Fig. 39. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin aan gethymectomeerde bestraalde dieren die een primaire reactie hadden ondergaan 4 weken voor deze immunisatie.

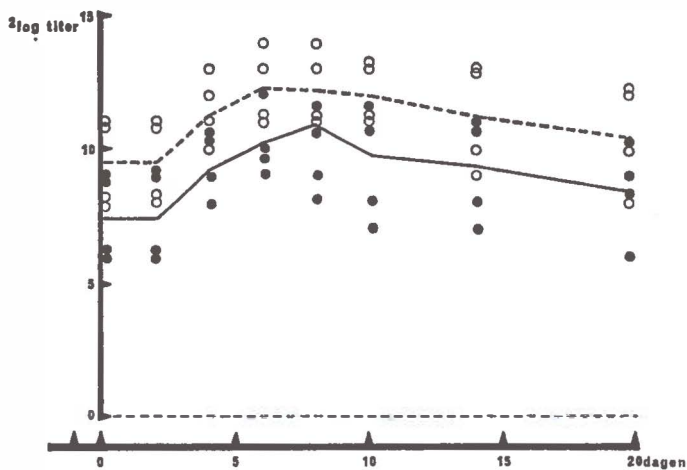


Fig. 40. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin aan dieren die voor de eerste keer waren geïmmuniseerd 8 weken na een drie keer herhaalde bestraling uitgevoerd met thymus bescherming.

— controlegroep (drie keer bestraalde dieren met thymusbescherming).

Ondanks de passieve immunisatie is in deze dieren IgG productie reeds gedurende de eerste dagen na antigeentoediening waarneembaar (fig. 40).

Discussie

In de boven beschreven experimenten bleek dat T-celloze dieren na een tweede kontakt met paratyfusantigeen in staat waren tot een zeer geringe IgG produktie. Het is eveneens duidelijk dat deze produktie niet zou voldoen aan de criteria van een secundaire reaktie. Dat sluit echter de mogelijkheid niet uit dat hier wel sprake is van de expressie van memory, maar dan van memory in de B-cel-populatie. Een andere mogelijkheid is, dat deze IgG synthese niet het gevolg is van een door het antigeen geïnduceerde verandering in de groep immunocompetente cellen, maar dat deze verandering „spontaan” door de tijd is ontstaan, m.a.w. dat de „helper-celfunctie” is hersteld. Dat is een proces dat bij neonataal gethymectomeerde muizen is waargenomen, ook wanneer de thymus in toto is verwijderd (ROGISTER 1965, DUKOR c.s. 1966, SINCLAIR 1967). Mogelijk wordt dit veroorzaakt door een multiplicatie van cellen die reeds voor de thymectomie een thymuspassage hebben ondergaan. Het is denkbaar dat een dergelijk proces ook na thymectomie en bestraling in het volwassen konijn een rol speelt. Voor de derde mogelijkheid, nl. dat de thymectomie niet volledig is geweest, werden in deze dieren bij obduktie geen aanwijzingen gevonden.

Een gering aantal konijnen bleek in parallelle experimenten na dezelfde procedure als hier is toegepast, in staat een allogeen huidtransplantaat uit te stoten (zie blz. 85). Ook in die gevallen werden geen thymusresten in het operatiegebied aangetroffen. Meestal bleek er wel een zeker herstel van het T-cellen systeem te zijn opgetreden. In de hier beschreven experimenten werden geen huidtransplantaties uitgevoerd, zodat we de aan- of afwezigheid van T-cellen naar dit criterium niet hebben kunnen vaststellen. Of de gevonden IgG synthese de manifestatie van memory in de B-groep is, dan wel het effect van koöperatie tussen B-cellen en een zeer gering aantal T-cellen, staat dus niet vast. Het is echter evident dat „T-celloze dieren”

niet tot een „secundaire reactie” in staat zijn. Dieren die drie keer zijn bestraald met bescherming van de thymus, zijn dat wel (fig. 40).

Het onvermogen van een gethymectomeerd, bestraald dier om IgG te produceren na een herhaalde antigeentoediening, berust dus waarschijnlijk op het ontbreken van T-cellen. Ook de IgG synthese in de „secundaire reactie” is dus thymus-afhankelijk. Dit betekent, dat de B-memory-cel de hulp van een T-cel nodig heeft om de opgebouwde memory tot expressie te brengen. Volstaat nu voor deze helperfunctie de aanwezigheid van een virginale T-cel, of moet dit een T-memorycel zijn? Om de mogelijkheid te onderzoeken, dat een combinatie van B-memory-cellen en virginale T-cellen tot een secundaire reactie in staat is, hebben we thymocyten aangeboden aan dieren waarin „in vivo geïsoleerde en geïmmuniseerde” B-cellen aanwezig waren, en vervolgens antigeen toegediend onder omstandigheden waarin een secundaire reactie waarneembaar zou zijn.

Experimenten

— Donoren: 6 normale konijnen werden gethymectomeerd en de thymussen werden twee aan twee tot een suspensie verwerkt. De drie celsuspensies bevatten resp. $3 \cdot 10^8$, $2,5 \cdot 10^8$ en $2 \cdot 10^8$ cellen per ml. Hierin zaten resp. 60 %, 50 % en 70 % levende cellen. Aan de receptoren werden uiteindelijk $10 \cdot 10^8$ levende cellen toegediend.

— Receptoren: 3 dieren werden gethymectomeerd en vervolgens drie keer bestraald (450 rad) met tussenpozen van 14 dagen. 16 Weken na de laatste bestraling werd paratyfusvaccin, in een totale dosering van $6 \cdot 10^7$ micro-organismen intraveneus, interscapulair en subcutaan in linker en rechter achterpoot toegediend.

4 Weken later werd passief geïmmuniseerd en 24 uur later werd i.v. de boven beschreven celsuspensie, onmiddellijk gevolgd door paratyfusvaccin ($6 \cdot 10^7$ micro-organismen) toegediend. Eén dier overleed tijdens de transfer.

Resultaten

De twee overblijvende dieren vertonen een aanzienlijk verschil in titerverloop (fig. 41, fig. 42). Een van die dieren bereikt een IgM titer van 6, de andere van 10 (2 log titer). Terwijl in het eerste dier geen

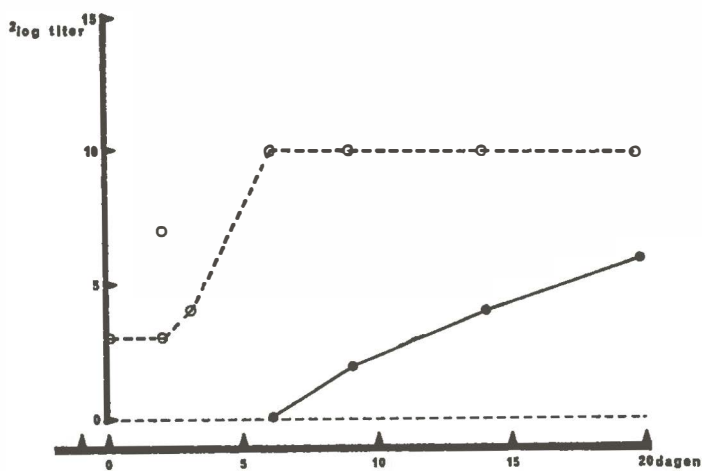


Fig. 41. Zie fig. 42.

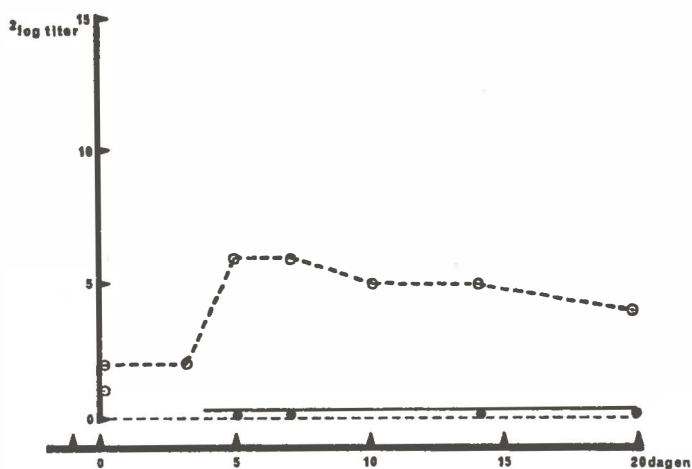


Fig. 42. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin, 24 uur na passieve immunisatie, aan gethymectomeerde bestraalde dieren, die een primaire reactie hadden ondergaan 6 weken na de laatste bestraling. Simultaan met deze tweede immunisatie ontvingen deze dieren een thymocyten-suspensie intraveneus.

IgG produktie waarneembaar is, vertoont het tweede dier een langzame stijging van de IgG titer vanaf \pm de 8e dag.

Discussie

Men zou kunnen veronderstellen dat het gebruik van thymocyten als substituuat van virginalen T-cellen betrekkelijk zinloos is. Een aantal onderzoekers beschrijft, dat de competentie van deze cellen t.a.v. het in stand houden van de T-celfunctie in een gethymectomeerd dier gering is (TRAININ c.s. 1965, MILLER en OSOBA 1967). Daarentegen vonden andere onderzoekers die ongeveer 10 keer zoveel thymocyten gebruikten (YUNIS c.s. 1964), een goede substitutie van zowel allogene als isologe cellen. MILLER meent dat substitutie met thymocyten effectief kan zijn wat de helperfunctie betreft, wanneer antigeentoediening en substitutie tegelijkertijd plaats vinden. In zijn experimenten hadden onder die omstandigheden 10^7 thymocyten dezelfde competentie als een even groot aantal ductus thoracicus-cellen. $5 \cdot 10^7$ Thymocyten leidden zelfs tot een aanzienlijk hogere reactie (MILLER en MITCHELL 1968). Ook in konijnen lijken thymocyten competent te zijn wanneer ze simultaan met het antigeen worden toegediend: VELDMAN (1970) vond een plasma-cellulaire reactie in een T-celloos konijn onmiddellijk na het toedienen van thymocyten van twee verschillende donoren.

Ook in onze experimenten heeft dus waarschijnlijk kooperatie tussen competente virginalen T-cellen en B-memorycellen kunnen plaats vinden. Dit heeft echter niet tot een secundaire reactie geleid. De secundaire reactie die werd waargenomen (fig. 36) in een T-celloos dier, na substitutie met lymfkliercellen uit een dier waarin de T-cellen na „isolatie in vivo” waren geïmmuniseerd, lijkt dus te zijn veroorzaakt door de aanwezigheid van zowel T- als B-celmemory.

Tot nu toe hebben we geen expressie van een dergelijke T-celmemory via een virginale B-cel gevonden, noch in de experimenten waarin lokaal werd bestraald (fig. 37), noch in de experimenten waarin de affiniteit werd getoetst (fig. 38). Door een aantal onderzoekers werden echter wel aanwijzingen gevonden voor een dergelijke kooperatie. Voorafgaande immunisatie met de carrier leidde in een aantal gevallen tot een hogere antihapteen reactie, wanneer de hapteen-carrierkombinatie werd aangeboden (KETTMAN en DUTTON 1970, 1971; RAJEWKY en ROTTLÄNDER 1967). Bij andere carrierhapteenkombinaties werd dit echter niet gevonden (LEVINE 1967). Ook immunisatie van T-cellen met kippegammaglobuline leidde na

kombinatie van deze cellen met virginale B-cellen, niet tot een secundaire reactie (MILLER en SPRENT 1971).

In die gevallen waarin wel effect van carriërimmunisatie werd gevonden, is dit wel verklaard uit een tekort aan T-cellen met de carriërspecificiteit in het virginale dier. Dit zou worden aangevuld door de proliferatie van deze cellen na immunisatie met de carriër (KETTMAN en DUTTON 1970). Wanneer deze verklaring juist is, zou dit kunnen betekenen dat „T-celmemory” niets anders is dan een - niet selectieve - proliferatie van cellen met dezelfde eigenschappen als virginale T-cellen. Uiteraard is het evengoed mogelijk dat het hier beschreven effect van carriërimmunisatie berust op het ontstaan van T-memorycellen met andere eigenschappen, dan virginale T-cellen.

Een waarneming van MILLER en SPRENT (1971) suggereert, dat althans het effect van „T-celmemory” overeenkomt met het effect van een groot aantal virginale T-cellen: Na behandeling van een ductus thoracicuscel-suspensie uit een geïmmuniseerde chimere met een antiserum, gericht tegen het genotype van de T-cellen uit de chimere, verloren deze cellen het vermogen om te reageren volgens een secundair reactiepatroon. Dit vermogen kon worden hersteld door $5 \cdot 10^5$ ductus thoraciscellen uit een geïmmuniseerde donor aan te bieden, maar ook door $5 \cdot 10^6$ virginale ductus thoraciscellen te geven. In vergelijkbare experimenten, waarbij een geïmmuniseerde milt-cellensuspensie met een anti-theta-serum werd behandeld, had substitutie met virginale T-cellen geen effect (TAKAHASHI c.s. 1970).

In onze experimenten bleek het geven van 10^8 thymocyten geen effect te sorteren; of het mogelijk is, om door een kwantitatief optimale of supra optimale substitutie wel een secundaire reactie te bereiken, is in vivo moeilijk te bepalen. Bij wijze van kasuïstiek volgen hier experimenten waarin langs een geheel andere weg een mogelijk niet onaanzienlijke substitutie met virginale T-cellen - per ongeluk - werd bereikt.

In een serie experimenten, die gedeeltelijk aan deze serie parallel liep, werden konijnen gethymectomeerd en vervolgens drie keer bestraald, overeenkomstig de hier reeds beschreven methode. 2 Weken na de laatste bestraling ontvingen deze dieren een huidtransplantaat. 2 Dieren uit deze serie stootten dit transplantaat uit, na resp. 33

en 33-56 dagen. 10 Weken na de laatste bestraling ontvingen deze dieren paratyfusvaccin ($6 \cdot 10^7$ micro-organismen intraveneus). De antilichaamproduktie tegen dit antigeen bleek uit IgM antilichamen te bestaan (bepaald m.b.v. scheiding op een sephadexkolom). Waarschijnlijk waren op dat moment voldoende T-cellen aanwezig voor een effectieve transplantatiereactie, maar nog onvoldoende voor de IgG produktie tegen paratyfus. Er mocht echter worden verondersteld, dat het T-cellensysteem in deze dieren zich langzamerhand zou herstellen. Uiteindelijk zou een situatie kunnen ontstaan, waarin een groot aantal virginale T-cellen en een aantal B-memorycellen aanwezig zouden kunnen zijn. Mogelijk zou op deze manier de door MILLER en SPRENT (1971) beschreven situatie, waarbij virginale T-cellen B-memorycellen in staat stelden tot een secundaire reactie, kunnen worden gereproduceerd. We hebben geprobeerd een dergelijke secundaire reactie in deze dieren te induceren.

Experimenten

± 7 Maanden na de primaire reactie ontvingen de 2 bovenbeschreven dieren een bestraling van de milt (750 rad). 5 Dagen later werd paratyfusvaccin ($6 \cdot 10^7$ micro-organismen i.v.) toegediend, 6 uur later gevolgd door passief antilichaam. 10 Weken na deze tweede antigeentoediening werd, toen de titer aan circulerende antilichamen enigszins was gezakt, eerst passief geïmmuniseerd - pro forma - en vervolgens werd 24 uur later paratyfusvaccin ($6 \cdot 10^7$ micro-organismen i.v.) gegeven.

Resultaat

- antigeentoediening na lokale bestraling (fig. 43).
Vanaf de 6e, resp. 14e dag was in deze dieren IgG produktie waarneembaar. De totale antilichaamproduktie bereikte een titer van 8, resp. 10, op de 6e dag na antigeentoediening.
- antigeentoediening na passieve immunisatie, 10 weken na de bovenbeschreven immunisatie.
Na deze 3e immunisatie steeg de IgG titer van 4 tot 8 resp. van van 2 tot 5, in 6 dagen (fig. 44).

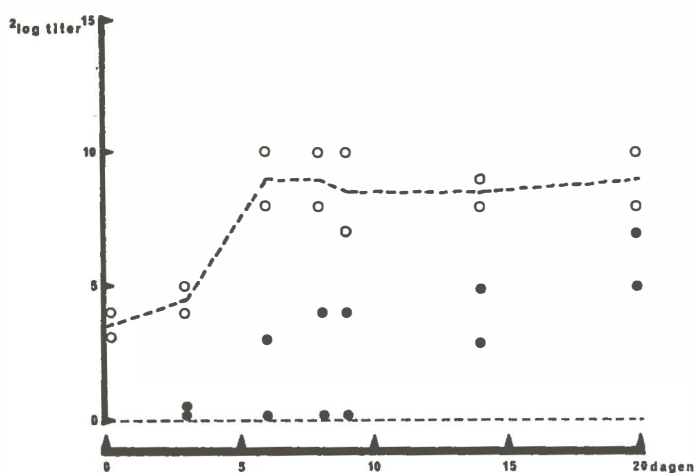


Fig. 43. Titerverloop van de H-agglutinenen na toediening van paratyfusvaccin, 5 dagen na een lokale bestraling van de milt. Deze twee dieren waren gethy-mectomeerd en 3 x bestraald, doch stootten een allograft uit. Ten tijde van die uitstoting werd voor de eerste keer antigeen toegediend. De titerwaarden van de mercapto-ethanol resistente antilichamen zijn als punten weergegeven.

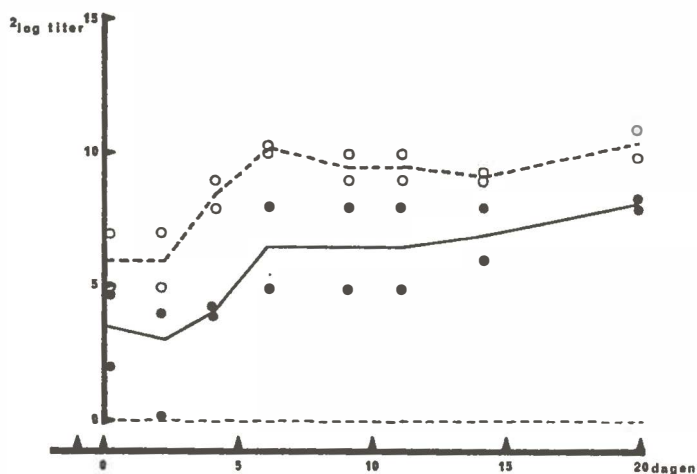


Fig. 44. Verloop van de H-agglutinenen na paratyfus toediening aan de dieren beschreven bij fig. 43. 24 Uur voor deze - derde - immunisatie werd passief geïmmuniseerd.

Discussie

Het is mogelijk dat in de hierboven beschreven dieren een aantal T-cellen de 3 x herhaalde bestraling heeft overleefd, en dat deze cellen verantwoordelijk zijn geweest voor de transplantatuitstoting, die in beide dieren reeds ongeveer 5 weken na de laatste bestraling begon. In dat geval zou de situatie overeenkomst vertonen met die in neonataal gethymectomeerde muizen, waarvan beschreven is dat er een vrijwel volledig herstel van de helperfunctie kan optreden.

Een andere mogelijkheid is, dat de thymectomie niet volledig is geweest, hoewel er bij obduktie geen thymusrest in het operatiegebied werd gevonden. Ook de mogelijkheid van aberrant thymusweefsel zou overwogen kunnen worden. Ook in deze laatste 2 situaties mag men verwachten, dat een half jaar na de transplantatuitstoting een redelijk herstel zal zijn opgetreden. Toen echter een half jaar na de transplantatuitstoting opnieuw antigeen werd gegeven, bleek na lokale miltbestraling geen secundaire reactie op te treden. Dat er op dat moment wel T-cellen waren, wordt gesuggereerd door de vrij aanzienlijke IgG synthese, die vanaf de 6e, resp. 14e dag, optrad. Verder bleek 10 weken later een „secundaire” reactie waarneembaar na een derde antigeentoediening.

We hebben dus geen aanwijzingen kunnen vinden dat virginale T-cellen in staat zijn B-memorycellen te induceren tot een secundaire reactie, noch na substitutie met allogene thymocyten (fig. 40, 41), noch na „substitutie” met autologe T-cellen. Uiteraard is het mogelijk dat in beide situaties nog onvoldoende virginale T-cellen aanwezig zijn. Of in sommige experimentele omstandigheden koöperatie tussen (zeer veel) virginale T-cellen en B-memorycellen ook in het konijn tot een secundaire reactie zou kunnen leiden is op grond van deze experimenten dus niet duidelijk. Daar een betrekkelijk gering aantal lymfkliercellen, ($2 \cdot 10^7$) waaronder zich „geïmmuniseerde T-cellen” bevonden, B-memorycellen in staat stelden tot een redelijke secundaire reactie (fig. 36), lijkt het onwaarschijnlijk dat onder normale omstandigheden memoryvorming in de T-celgroep beperkt zou zijn tot een aselektieve proliferatie van cellen met dezelfde eigenschappen als virginale cellen. Waarschijnlijk is dus ook in de T-celpopulatie sprake van een kwalitatieve verandering van de samenstelling van die groep.

Op grond van onze experimenten is niet vast te stellen of dit een selektieve vermenigvuldiging, of een produktie van cellen met nieuwe eigenschappen is. Er zijn aanwijzingen dat de specificiteit van virginale cellen die betrokken zijn bij de specifiek-cellulaire-reaktie al zeer hoog is (PAUL c.s. 1971). Dat sluit op zich de mogelijkheid niet uit, dat er toch nog een selektie op specificiteit plaats vindt tijdens de memoryvorming. Er zijn echter ook aanwijzingen dat de carrier specificiteit - een eigenschap van de T-cel - niet verandert in de loop van een reaktie (PAUL c.s. 1968). Als er al selektie plaats vindt tijdens de produktie van T-celmemory, dan lijkt dit dus niet een selektie op specificiteit te zijn. In de laatst genoemde experimenten van PAUL bleek de hoeveelheid antigeen die nodig was om een bepaalde DNA stimulatie in vitro te geven in de loop van een half jaar niet te veranderen. Dat zou kunnen betekenen, dat de antigeen-verwerkende kwaliteit van de T-memorycel niet anders is dan die van de virginale T-cel. Het is denkbaar dat memoryvorming in de T-cel niet de afferente kant van de T-cel betreft, maar de efferente kant, bijvoorbeeld de antigeen-overdracht, of de produktie van factoren die de B-cel beïnvloeden. Memory zou in dat geval, wat de B-cellen betreft, bestaan uit een differentiatie, waarschijnlijk gekombineerd met proliferatie.

Enige opmerkingen over de interaktie tussen T- en B-cellen

Het aantal spekulaties over het interaktie-mechanisme is aanzienlijk groter dan het aantal konkrete gegevens. De in deze studie beschreven experimenten lijken één konkreet gegeven op te leveren, nl. dat die interaktie soms wel, en soms niet nodig is.

Dat is een uitspraak die nader gepreciseerd kan worden; IgM competente B-cellen zijn soms afhankelijk van koöperatie, IgG competente B-cellen steeds. Een dergelijke, waarneming noodt tot een spekulatie, en wel over de vraag, waarin IgM cellen dan toch verschillen van IgG cellen. Het is denkbaar dat dit verschil in de competente cel voornamelijk tot uitdrukking komt in de receptoren; IgM cellen hebben waarschijnlijk receptor antilichamen van diè klasse, IgG cellen hebben waarschijnlijk IgG fragmenten aan hun oppervlak. Dit verschil in receptoren zou verantwoordelijk kunnen zijn voor het verschil in verspreiding van het antigeen over het oppervlak van de

competente B-cel. Het is denkbaar dat het effect van een contact tussen cel en antigeen afhankelijk is van de wijze van prikkeling van die cel. Zo kan tolerantie, resp. inductie tot antilichaamvorming worden opgewekt door variatie in het aantal antigeen-moleculen. Het antigeen-depot in een follikelcentrum lijkt bijv. te leiden tot proliferatie.

Zou nu de aanwezigheid van een T-cel kunnen leiden tot een zodanige verdeling van het antigeen over de B-cel dat een „inducerende configuratie” ontstaat? De configuratie van het antigeen aan het celoppervlak zal in de eerste plaats afhankelijk zijn van de plaats en de aard van de receptoren op de B-cel. De T-cel zou dus de rangschikking van die receptoren kunnen beïnvloeden. Het is ook denkbaar dat de T-cel het antigeen over de bestaande receptoren ordent, zodat een inducerende configuratie ontstaat.

Op welke wijze zou een dergelijke beïnvloeding van de configuratie van het antigeen op de B-cel, of van de receptoren van die cel, kunnen plaatsvinden? In de meeste speculaties over het koöperatie-mechanisme wordt uitgegaan van een cel-lichamelijk contact tussen T- en B-cellen. Zelfs wanneer men er van uitgaat dat een T-cel in de milt migreert via de sinus marginalis (FORD 1969), dan lijkt toch de noodzaak van een contact tussen twee zeldzame cellen, die meestal in verschillende regionen van een lymfoïd orgaan verblijven, voor de inductie van de humorale reactie een weinig efficiënt mechanisme. Waarschijnlijker lijkt, dat de functie van de T-cel wordt geëffektueerd via een humorale mediator. Wat de aard van die mediator betreft, zou men kunnen denken aan een op een antilichaam gelijkende stof. Het is bekend, dat de antigeen configuratie die ontstaat door een kompleks van IgG en antigeen kan induceren tot tolerantie (FELDMAN en DIENER 1970). Kombinatie van IgM en antigeen leidde daarentegen tot een stimulering van de reactie tegen schapenerythrocyten (HENRY and JERNE 1968). Juist in de reactie tegen dit antigeen zou het aantal T-cellen een beperkende faktor kunnen zijn, daar proliferatie van die cellen (door antigene stimulering) leidde tot een toename van de antilichaamvorming (KETTMANN en DUTTON 1971). In deze situatie lijkt het dus niet uitgesloten te zijn dat IgM en T-cel éénzelfde effect hebben. Men zou derhalve geneigd kunnen zijn om te vermoeden dat de „T-cel mediator” een antilichaam is, met eigenschappen die lijken op die van het IgM.

De functie van de T-cel bij de interactie zou, zoals uit bovengenoemde overwegingen blijkt, kunnen zijn: het aanbrengen van een „inducerende” verdeling van het antigeen op de B-cel.

Dit zou een herverdeling van het reeds op de B-cel aanwezige antigeen kunnen zijn, of een speciale wijze van aanbieding van het antigeen aan de nog ongerepte B-cel. In ieder geval is een direct contact van B-cellen met antigeen mogelijk, zoals blijkt uit de proliferatie van de B-cel bij de memoryvorming, die immers mogelijk is zonder T-cel. Verder blijkt dat het interactie-effekt soms kan worden nagebootst door een graft-versus-host reactie, waarbij de T-cellen niet door het *betreffende* antigeen, maar door histoïncompatibiliteitsfactoren worden geïnduceerd (EKPAKA-MENSAH en KENNEDY 1971, KATZ c.s. 1971, KRETH en WILLIAMSON 1971). Het effect van de T-cel lijkt dus eerder een remodelering van reeds op de B-cel aanwezig antigeen te zijn. In het concept van KRETH en WILLIAMSON zou de T-cel zelf bij de interactie worden „geïnduceerd” door de als gevolg van de antigeenbinding veranderde structuur van het B-cel-oppervlak. Alles tezamen zijn er o.i. duidelijke aanwijzingen dat het effect van die inductie niet beperkt blijft tot de productie van een mitogene faktor zoals gepostuleerd door EKPAKA-MENSAH en KENNEDY (zie boven). De bovengenoemde modellen voor de T-B interactie, en de argumenten daarvoor suggereren dat de T-cel iets „verandert” aan een eerder gevormd B-cel - antigeen kompleks. Ze lijken moeilijk te rijmen met het „koncentratie concept” van MITCHISON (1969), waarbij het antigeen opgeslagen op de T-cel aan de B-cel wordt aangeboden.

De mogelijke betekenis van de T-cel voor de regulatie van de humorale afweer

Het is niet zonder meer duidelijk dat de obligate aanwezigheid van een T-cel bij de inductie van de IgG synthese doelmatig is. Recente onderzoeken geven echter mogelijk wel enige aanwijzingen over de betekenis van de interactie voor het in stand houden van het organisme.

Wanneer een B-memory cel van hoge aviditeit wordt geïnduceerd, is de kans groot dat er antilichamen ontstaan die een sterke neiging tot kruisreactiviteit vertonen (LITTLE en EISEN 1969) en dus voor

het organisme schadelijk kunnen zijn. Dit zou met name het geval zijn, wanneer dergelijke cellen ook *geïnduceerd* zouden kunnen worden door „kruisreagerende” antigenen. Dergelijke antigenen zullen zich in principe aan de receptoren van die B-memory-cel kunnen binden. In het hierboven genoemde concept zou deze binding echter niet leiden tot een inductie tot antilichaamvorming, zolang er voor dat kruisreagerende antigeen niet ook T-memory cellen aanwezig zijn. In onze experimenten bleek namelijk (fig. 41, 42 en fig. 43) dat virginale T-cellen niet in staat zijn B-memory cellen te induceren.

Nu is gebleken dat van een carrier-hapteen immunogeen het carrier-deel zeer nauwkeurig wordt onderscheiden (PAUL c.s. 1971), en verder dat dit onderscheidingsvermogen t.a.v. de carrier in de loop van een reactie werd gehandhaafd (PAUL c.s. 1968). Wanneer men hieraan toevoegt dat de relevante carrier herkende cel een T-cel is, dan lijkt de exclusiviteit van de inductie van de reactie na voorafgaande immunisatie vooral gewaarborgd te zijn door de T-memory-cel. Zo zou ondanks het feit dat de B-memory-cel, als gevolg van zijn grotere affiniteit en geringere specificiteit, een geringe exclusiviteit heeft, de ongebreidelde inductie tot produktie van zeer avide antilichamen voorkomen kunnen worden.

Uiteraard is het produkt van een reactie niet specifiek dan de B-cel was; het potentiële gevaar van de aanwezigheid van sterk kruisreagerende antilichamen van hoge aviditeit wordt echter beperkt door de korte levensduur van die antilichamen.

SAMENVATTING

In het eerste hoofdstuk wordt het onderscheid tussen T- en B-cellen beschreven. De uit de thymus afkomstige T-cellen spelen een rol bij de cellulaire immuniteit, B-cellen zijn de voorlopers van de antilichaamvormende cellen. De funktionele capaciteiten van deze cellen en de aanwijzingen voor een interactie tussen T- en B-cellen in de humorale en specifiek cellulaire immuunreactie worden besproken.

Tenslotte wordt als vraagstelling geformuleerd:

- a. Welke rol speelt de interactie tussen T- en B-cellen bij de antilichaamvorming in de primaire reactie.
- b. Welke rol speelt de interactie bij de memoryvorming, dwz. bij de veranderingen in de samenstelling van de groep immuno-competente cellen tijdens de primaire reactie.
- c. In welke cellen (T- en/of B-cellen) wordt memory opgebouwd.
- d. Welke cellen spelen een rol in de secundaire reactie.

In hoofdstuk II worden de materialen besproken, en de methoden volgens welke die materialen werden toegepast, om bovenstaande vragen te kunnen beantwoorden. Als proefdieren werden konijnen gebruikt; er werden twee antigenen toegepast, nl. paratyfus H-antigeen en paardengammaglobuline.

In hoofdstuk III worden experimenten besproken waarin de betekenis van de interactie tussen T- en B-cellen voor de primaire reactie wordt geanalyseerd.

In een groep T-celloze konijnen werd het vermogen tot antilichaamproduktie bepaald. Deze groep werd verkregen door thymectomie op volwassen leeftijd, gevolgd door een 3 x herhaalde subletale totale bestraling (450 rad). Als controlegroep werden dieren gebruikt die eveneens drie keer waren bestraald, maar waarbij de thymus tijdens de bestraling was beschermd. Aan deze twee groepen

dieren werd 4-17 weken na de laatste bestraling zowel Paratyfus-H-antigeen, als paardengammaglobuline toegediend. In normale onbestraalde controledieren bleken deze antigenen geen kruisreactie te vertonen, en de combinatie van beide antigenen beïnvloedde het titerverloop tegen elk antigeen afzonderlijk niet.

In de T-celloze groep bleek een normale IgM produktie tegen paratyfus-H-antigeen op te treden. De produktie van IgG (mercaptoethanol resistente) antilichamen was niet waarneembaar (fig. 8). Tegen paardengammaglobuline werd in deze dieren noch IgM noch IgG gevormd (fig. 11). In de controlegroep - T-cel houdende - dieren was tegen beide antigenen IgM en IgG produktie waarneembaar (fig. 9, fig. 12).

In T-celloze konijnen is dus tegen het ene antigeen, (nl. paratyfus-H) wel IgM produktie mogelijk, tegen het andere antigeen (nl. Pgg) niet. Ook in andere onderzoeken lijkt de thymus-afhankelijkheid van IgM-produktie te variëren met de eigenschappen van het antigeen. Daarentegen is tegen beide door ons gebruikte antigenen de IgG synthese thymusafhankelijk. Daarmee in overeenstemming is de waarneming van andere onderzoekers, dat variatie in de eigenschappen van het antigeen in T-celloze dieren niet leidt tot IgG synthese. Het lijkt dus niet onwaarschijnlijk dat de B-cel die in staat is tot IgG synthese, voor zijn inductie steeds de hulp van een T-cel nodig heeft.

Bij de experimenten in de controlegroep, nl. de dieren die tijdens een drie keer herhaalde subletale totale bestraling thymus-bescherming ontvingen, bleek dat er een aanzienlijk verschil bestond in de herstelsnelheid van het vermogen tot IgG produktie en van het vermogen tot IgM produktie. De periode die verstreek voor de IgG produktie na een dergelijke bestraling weer was genormaliseerd, duurde \pm 8-16 week (fig. 9, 10). Het herstel van het vermogen tot IgG synthese werd verder geanalyseerd in experimenten waarin een éénmalige totale subletale bestraling werd toegepast. De eerste fase van de IgG synthese, die in het normale dier gekenmerkt wordt door een zeer snelle stijging van de IgG titer, blijkt na een bestraling pas na enkele weken weer mogelijk. Daarentegen herstelt de tweede fase van de IgG synthese, die gekenmerkt wordt door een langzame exponentiële verdere stijging, zich bijzonder snel na een bestraling,

ten minste even snel als het vermogen tot IgM produktie (fig. 20, 21).

Vervolgens werd geprobeerd aanwijzingen te verkrijgen over de herkomst van de cellen betrokken bij de IgG synthese. Hierbij werd overwogen dat in principe twee soorten bronnen in aanmerking zouden kunnen komen: autonoom immunocompetente cellen producerende organen (bursa equivalent) of door antigeen geïnduceerde follikelcentrumreacties (NIEUWENHUIS, 1971).

Het verloop van het herstel van het vermogen tot IgG produktie werd niet positief beïnvloed door: thymus bescherming, (fig. 17, 18) appendix-bescherming (fig. 24), of bescherming van alle andere organen dan de milt (fig. 24), en evenmin door toediening van een niet kruisreagerend antigeen (fig. 26, 27, 28). Uit deze waarnemingen werd de konklusie getrokken, dat de produktie van immunocompetente B-cellen voor de IgG produktie niet in een autonoom producerende bron, dwz. een bursa- of thymus equivalent, geschiedt. Evenmin lijken de immunocompetente cellen voor de IgG synthese te worden gevormd in (follikelcentrum) reacties geïnduceerd door antigenen met een volledig andere specificiteit, zoals voor de IgM-cellen aannemelijk is gemaakt. Als hypothese wordt genoemd de mogelijkheid dat de produktie van deze cellen voor de eerste fase geschiedt in - follikelcentrum - reacties, geïnduceerd door „kruisreagerende” antigenen. Verdere experimenten (zie hoofdstuk IV) leidden tot de hypothese dat bij de tweede fase van de IgG synthese cellen betrokken zijn die werden gevormd tijdens deze reactie zelf en dus als „memory cellen” moeten worden beschouwd.

In hoofdstuk IV worden experimenten beschreven, die ten doel hadden te komen tot een operationele definitie van de secundaire reactie. Als eerste uitgangspunt werd hierbij genomen de waarneming (fig. 24) dat lokale bestraling van de milt IgG synthese in de primaire reactie enige tijd (± 14 dagen) geheel onmogelijk maakt. Uit deze waarneming werd gekonkludeerd, dat competente cellen voor de eerste fase van de IgG synthese niet in grote getale naar de bestraalde milt migreren. De mogelijkheid werd overwogen dat in een immuun dier wel een sterke migratie van memory cellen mogelijk zou zijn. Antigeen toediening na lokale bestraling in een immuun dier leidde inderdaad tot een antilichaamvorming waarbij kort na de stimulering

de IgG synthese op gang kwam, en die dus het normale patroon vertoonde van een secundaire reactie. In een controle experiment bleek echter dat die IgG synthese voor een belangrijk deel buiten de milt plaats vond; splenectomie belemmerde namelijk de secundaire reactie niet. Blijkbaar waren onder deze omstandigheden memorycellen buiten de milt aanwezig en is het de induceerbaarheid van deze perifere cellen die onder deze omstandigheden een secundaire reactie mogelijk maakt.

Het tweede uitgangspunt voor het zoeken naar een (tweede) operationele definitie van de secundaire reactie vormde de waarneming uit onze en uit andere experimenten, dat passieve immunisatie de primaire reactie belemmert. In deze experimenten leidde passieve immunisatie 24 uur voor de antigeentoediening tot een belemmering van de IgM produktie en van de eerste fase van de IgG produktie. Passieve immunisatie 6 uur na de antigeen toediening leidde alleen nog maar tot belemmering van de eerste fase van de IgG synthese (fig. 25, fig. 32). De tweede fase van de IgG synthese bleek normaal door te gaan. Gekonkludeerd werd, dat de inductie van de eerste fase van de IgG synthese plaats vindt op een ogenblik dat de inductie van de IgM synthese reeds geheel is afgesloten.

Het was te verwachten dat passieve immunisatie de secundaire reactie niet zou belemmeren, zodat de aanwezigheid van IgG synthese na een passieve immunisatie een operationele definitie van de secundaire reactie mogelijk zou maken. Dit vermoeden kon worden bevestigd door passieve immunisatie van een groep dieren, 24 uur voor een tweede antigeentoediening (fig. 33). Deze waarnemingen suggereerden bovendien dat cellen voor de tweede fase van de IgG synthese wat hun affiniteit betreft, dezelfde eigenschappen hebben als memory cellen. Dit leidde tot de hypothese, dat deze cellen tijdens de primaire reactie tegen het betreffende antigeen worden gevormd.

In hoofdstuk V werd in de eerste plaats aan de orde gesteld de vraag of voor memoryvorming op zichzelf interactie tussen T- en B-cellen nodig is. Wanneer dit niet het geval is, moest het mogelijk zijn om in een combinatie van „geïmmuniseerde in vivo geïsoleerde T-cellen” met „geïmmuniseerde in vivo geïsoleerde B-cellen” een secundaire reactie op te wekken. Dit experiment werd uitgevoerd door T-celloze dieren (fig. 3) paratyfus-H-antigeen aan te bieden.

Deze dieren werden daarna gereconstitueerd met een lymfeklier-suspensie uit een donor die geïmmuniseerd was op een ogenblik dat er slechts T-cellen geïsoleerd aanwezig waren (dwz. 48 uur na de laatste van drie bestralingen uitgevoerd met thymus-bescherming). De lymfeklier-extirpatie en de transfer van de celsuspensie vond 6 weken na de immunisatie plaats. De receptor werd 24 uur vóór de transfer passief geïmmuniseerd en ontving - voor de tweede keer - paratyfusvaccin simultaan met de transfer. Er volgde een antilichaamproduktie volgens het patroon van een secundaire reactie (fig. 36). Uit een controle-experiment bleek dat dit niet het gevolg was van een door de injectie van allogene cellen geïnduceerde graft-versus-host reactie (fig. 34). Deze controle was noodzakelijk door de beschrijvingen van een stimulering van de antilichaamvorming in aanwezigheid van een dergelijke reactie (ЕКРАНА-MENSAH en KENNEDY 1971). Gekonkludeerd werd dat memoryvorming niet van coöperatie tussen T- en B-cellen afhankelijk is.

Vervolgens werd onderzocht in welke cellen memoryvorming optreedt. Een dier dat alleen over geïmmuniseerde B-cellen, maar niet over T-cellen beschikte, bleek niet in staat tot een secundaire reactie (fig. 39). Evenmin was een dier dat geïmmuniseerde T-cellen, maar alleen ongeïmmuniseerde B-cellen bezat, hiertoe in staat (fig. 37, 38). Ook wanneer een dier met geïmmuniseerde B-cellen virginalle allogene thymocyten kreeg toegediend, bleek geen secundaire reactie op te treden (fig. 41, 42).

Tenslotte wordt een experiment beschreven in een gethymectomeerd en drie maal bestraald dier waarin na ± 5 weken het T-cellen-systeem klaarblijkelijk was hersteld (transplantaat uitstoting), mogelijk doordat de thymectomie onvolledig was geweest. Ook dit dier bleek niet tot een secundaire reactie in staat zolang niet ook het herstelde T-cellen systeem was geïmmuniseerd (fig. 43, fig. 44).

Uit deze waarnemingen werd gekonkludeerd dat:

1. ook de IgG synthese in de secundaire reactie thymus-afhankelijk is,
2. memory zowel in de T- als in de B-cel populatie wordt opgebouwd,
3. voor die memoryvorming geen interactie nodig is,
4. B-memory cellen niet door een virginalle T-cel kunnen worden geïnduceerd.

Tenslotte worden enkele suggesties gedaan over de manier waarop een T-cel een B-cel tot antilichaamproduktie zou kunnen induceren. Hierbij staat centraal de waarneming dat inductie tot proliferatie (nl. bij de memoryvorming) mogelijk is zonder dat er een T-cel aanwezig is. Dit suggereert, in overeenstemming met het „surveillance concept” (KRETH en WILLIAMSON 1971), dat de T-cel een verandering aanbrengt in het kompleks van antigeen en B-cel. De aandacht wordt gevestigd op de rol die de T-cel zou kunnen spelen bij het aanbrengen van een „inducerende antigeen configuratie” op de B-cel. Verder wordt gesuggereerd dat de relevantie van die interactie zou kunnen liggen in het voorkomen van een ongebreidelde inductie tot de produktie van sterk kruisreagerende antilichamen, door de hoog blijvende specificiteit van de T-cel, ook als „memory-cel”.

THYMUS DEPENDENCY OF THE ANTIBODY RESPONSE

SUMMARY

Introduction and objectives of experiments - Chapter I.

There has been accumulating evidence for the existence within the lymphoid system of two classes of lymphoid cells: the thymus derived, long-lived, recirculating T-lymphocytes populating the thymus dependent areas of peripheral lymphoid organs, and the non-thymus derived, presumably bursa derived (birds) or bursa-equivalent derived (mammals) or bone marrow derived B-lymphocytes represented i.a. by follicular lymphocytes and parafollicular lymphoid elements (marginal zone cells). Both types of peripheral lymphoid cells appear ultimately to be descendants from lymphoid stem cells proliferating in the bone marrow.

T-cells have been shown to represent the immunocompetent elements for specific cellular immune responses: for instance like homograft rejection and sensitization to chemical sensitizers. The B-cell population on the other hand comprises the antibody forming cell precursors (AFCP) and presumably the cells involved in germinal center reactions. It has been demonstrated that in a number of instances T-cells in addition play an obligatory role in the antibody response as so-called "helper cells". (MILLER and MITCHELL 1968, ROITT c.s. 1969). The anti-sheep erythrocyte primary hemolysin response of the mouse - including both IgM and IgG formation - is the best known example. The IgM response towards other antigens e.g. paratyphoid-B flagella is apparently independent of T-cell helper function both in the mouse, the rat and the rabbit. In carrier-hapten experimental systems in which anti-hapten antibody is produced, the apparently indispensable T-helper cells proved to have carrier-specificity. This was particular clear in anti-hapten secondary responses which were dependent on the presence of both B-"memory" cells (AFCP's) with anti-hapten specificity and T-"memory" cells having the specificity of the particular carrier used in the secondary immunogenic stimulation. When a carrier was used which differed

from that used in the primary response, a priming with the second carrier without the hapten was sufficient afterwards to allow a secondary antibody response against the hapten coupled to the second carrier. (RAJEWSKY c.s. 1969, MITCHISON 1971).

B-memory cell production has been attributed to germinal center reactions by some investigators. (THORBECKE c.s. 1962, 1964). The origin of T-cell memory has not been clearly defined so far.

The cooperation between T- and B-cells in thymus dependent antibody formation - either primary or secondary - has been the subject of much theoretical consideration. The mechanism of this interaction has largely remained a matter of speculation until now.

The objectives of the present investigation can be summarized as follows:

- (i) what is the basic role of B- and T-cells respectively in the primary response antibody formation and in what respect is the primary response antibody formation T-cell dependent;
- (ii) what is the role, if any, of T- and B-cell interaction in formation of immunological memory, i.e. in the change of composition of the immunocompetent cell population induced during the primary response;
- (iii) how can "memory" be defined in terms of the two cell populations (T and B) involved;
- (iv) what is the role of T- and B-cell interaction in secondary response antibody production.

Materials and methods - Chapter II.

Young adult rabbits (± 3 kg) were used throughout. The main experimental procedures, used singly or in combination, were the following. (a) Adult thymectomy; completeness of the operation was always checked at necropsy. (b) Sublethal total body X-irradiation with 450 rads, full back scatter included and symmetrically applied to obtain homogeneity of tissue dose; 200 KV, 15 mA, HVL 1,0 mmCu, skin-focus distance 80 cm, $i = 21$ r/min. (c) Sublethal whole body X-irradiation - as sub a - but with either the thymus, a lymph node, or the appendix shielded with a 2 mm lead sheet. (d) Local irradiation (750 rads) of single lymph nodes or the spleen.

Antibody forming potential was measured by assessing serum anti-

body titer curves in individual animals against two antigens: (a) *Salmonella java* (paratyphi-B) vaccine (6×10^8 formol killed organisms per ml) rich in flagellar (H-) antigen, and (b) Horse gamma globulin (Pentex). The antigens were administered either intravenously or intravenously and subcutaneously simultaneously. Double dilution agglutinin or passive hemagglutinin titers respectively were determined in each serum sample before (IgM) and after mercapto-ethanol treatment (IgG). Complete titer curves were determined from each individual animal.

Surgical removal of the spleen or a lymph node was sometimes done either for histological examination or to exclude the organ from further contributing to the antibody response.

Role of T- and B-cells in the primary response - Chapter III.

T-cell deprived rabbits were obtained by adult thymectomy followed after some 4 weeks by $3 \times$ sublethal whole body X-irradiation at intervals of 2 weeks. A control group of non-thymectomized animals was irradiated in a similar way but each time the thymic region was shielded. The groups consisted of 7 and 6 animals respectively. 4-17 Weeks after the 3rd irradiation the animals in both groups received first *Salmonella java* vaccine and 1 week later Horse gamma globulin. In a separate control experiment it was shown that antibody formation against either of these two antigens did not interfere within the antibody response to the other; neither was any cross-reactivity observed between the two antigen-antibody systems.

The T-cell deprived rabbits produced essentially normal IgM anti-flagellar agglutinin serum levels whereas IgG-agglutinin serum levels were completely absent (fig. 8). In the anti-HoGG primary response both IgM- and IgG-antibodies were entirely lacking (fig. 11).

In the animals that had been irradiated three times with the thymus shielded the *Salmonella java* H-agglutinin response, 8 and 16 weeks after the last irradiation, clearly demonstrated the restoration of IgG-responsiveness in addition to that of IgM (fig. 9 and 10). Upon HoGG these animals also proved to have regained both primary IgM- and IgG-antibody forming potential (fig. 12).

Experiments by other investigators have shown that the T-helper

cell dependency of the primary response IgM production may be determined either by the concentration (TAYLOR 1968, 1971) or by qualitative properties of the antigen itself (FELDMAN and BASTEN 1971). For the IgG production our results suggest that the T-helper cell dependency is a fundamental property of the B-cells involved, i.e. the IgG-AFCP.

In the group of 3 x irradiated, thymus shielded animals a considerable difference was observed between recovery of IgM and IgG responsiveness. Whereas the capacity to produce IgM had nearly completely returned by the 2nd or 3rd week after the last irradiation, IgG-responsiveness returned to normal only between 8 and 16 weeks (fig. 9 and 10). This difference was not correlated with any histological feature of lymphoid tissue regeneration.

The post-irradiation restoration of IgG responsiveness was further analysed in animals receiving a single sublethal (450 rads) total body X-irradiation. Only *Salmonella java* vaccine was used as the antigen. It was found that two clearly defined phases of primary response IgG formation could be distinguished, each with a characteristic pattern of serum antibody accumulation and with a different rate of post-irradiation recovery. The 8th and 14th day M.E.-titer were used as the parameters for these respective IgG producing processes. The first phase IgG production in non-irradiated rabbits consists of a rapid exponential rise of the serum titer between the 2nd and 8th day of the primary response. In the irradiated animals this IgG response was still below normal at 8 weeks post-irradiation (fig. 9) and had completely been restored only after 16 weeks (fig. 12). The second phase IgG is not easily detected when first phase IgG titers are high (cf. fig. 1 and 25) in normal animals. It consists of a continued slow exponential rise of the serum titer between the 7th and the 21th day of the response. This 2nd phase IgG responsiveness, expressed as 14th day M.E.-titers, was restored to normal levels as rapidly as the IgM-response (fig. 20 and 21), i.e. within 2 weeks post irradiation.

As these results suggested the existence of 2 separate classes of potentially IgG-producing AFCP's, experiments were performed to

investigate the possible origin of these respective cell classes. Essentially the following potential sources should be considered: a central - bursa equivalent (?) - lymphoid organ or correspondingly functioning structures in peripheral organs or antigen induced lymphoid reactions like the germinal center reactions. Germinal centers have been incriminated for producing B-memory cells (THORBECKE c.s. 1962) i.e. antibody forming cell precursors, mostly of the IgG-class, with specificities related to the antigen which had induced those particular germinal center reactions. NIEUWENHUIS (1971) on the other hand in irradiation experiments with the appendix shielded, with appendectomy or with appendicostomy provided evidence which strongly suggests that germinal center reactions in addition produce IgM-AFCP's with random specificities, i.e. seemingly unrelated to the antigen evoking the germinal center reaction.

First the mobility (through blood circulation) of these cells was investigated. A group of animals was subjected to local irradiation of the spleen region with the rest of the body shielded. 5 Days later *Salmonella java* vaccine was intravenously administered and a small dose of hyperimmune serum was given 6 hrs. after the antigen, so as to restrict the antibody response to the spleen. As shown in fig. 24, to be compared with the non-spleen irradiated controls shown in fig. 25 no production of first phase IgG could be detected, whereas IgM- and second phase IgG formation proceeded more or less normally. This result clearly demonstrates that no AFCP's for the first phase IgG production were supplied from other parts of the body.

In a second group of experiments the origin of the IgG precursor-cells was investigated. 2 Groups of animals received 450 rads X-irradiation: one group was irradiated with the thymus shielded, the second with the appendix region shielded. The recovery of primary IgG responsiveness - first and second type - was compared with that after total body irradiation; the antigen was again *Salmonella java* vaccine (H-antigen).

It was found that neither irradiation with the thymus shielded (fig. 17 and 18), nor with the appendix shielded (fig. 22 and 23) significantly accelerated recovery of first phase IgG-responsiveness; in contrast the restoration of IgM-responsiveness was markedly accele-

rated by appendix shielding like in the experiments of NIEUWENHUIS 1971). The effect on the second phase IgG responsiveness will be discussed later on.

From these results it is concluded that at least phase-I-IgG precursor cells are not autonomously produced by the thymus or the appendix.

To detect any possible role of antigenically unrelated germinal center reactions in producing random IgG-precursor cells, HoGG was given to induce germinal center reactions prior to the administration of Salmonella java test vaccine in 3 groups of animals at various moments with respect to sublethal whole body X-irradiation. In these animals, in which recovery of IgM- and second phase IgG-responsiveness again was rapid, no acceleration of first phase IgG regeneration was found (fig. 27 and 28). This result clearly shows that no phase-I-IgG-AFCP's with random specificities would seem to be produced by germinal center reactions evoked by unrelated antigens. By way of exclusion it is suggested that the spontaneous recovery of the ability to produce phase-I-IgG is evoked by antigenically related (possibly crossreacting) antigens. The precursor cells involved can be considered "memory cells" with respect to these latter antigens though possibly with only marginal specificity, enabling them to react upon more or less related antigens. The apparently low affinity towards these latter - see chapter IV - would seem to support this hypothesis. Regarding the origin of the second type of IgG precursors, namely those responsible for the 2nd phase IgG production, more information was obtained in the experiments to be reported in chapter IV.

Operational definition of the secondary response - Chapter IV.

As a first tentative starting point in defining the secondary response the above mentioned observation was chosen (fig. 24) that primary administration of antigen (Salmonella java vaccine) 5 days after local irradiation of the spleen - with the rest of the body shielded - would result in an antibody response with apparently normal IgM levels but without first phase IgG production. This observation was interpreted to signify that no IgG-AFCP's were available to the spleen by migration from the blood circulation. In addition it demonstrates

that their number present elsewhere and accessible to intravenously administered antigen was far below that of IgM-precursors. It was presumed that this situation might be entirely different in a secondary response, i.e. following previous priming.

In a first experiment 5 animals received an intravenous priming injection of *Salmonella java* vaccine. 28 Days later the spleen was locally X-irradiated (750 rads) and 2 days afterwards a second intravenous *Salmonella java* vaccine injection was given. An antibody response was observed (fig. 30) in which IgG-production was a predominant feature from the beginning, like in control secondary responses as shown in fig. 29. To further analyse whether the site of this IgG synthesis was in fact the - previously irradiated - spleen, this organ was surgically removed 2 days after the second antigen administration. This procedure only insignificantly or at most partly reduced IgG production (fig. 31).

Nevertheless local irradiation of the spleen proved to be a fully legitimate procedure for operationally defining secondary from primary responses. It may be held, though, to show the presence and antigenic accessibility of IgG-memory cells in extra-splenic sites rather than in the spleen itself.

A second tentative starting point in defining the secondary response was provided by the observation by other investigators (UHR and BAUMANN 1961) as well as by ourselves that passive immunization may severely impair primary response antibody information, while leaving the secondary response unaffected. In a first series of experiments passive administration of homologous hyperimmune serum 24 hrs. prior to *Salmonella java* vaccination clearly depressed the IgM and even considerably the first phase IgG response, while apparently leaving the second phase IgG unaffected (fig. 32). Hyperimmune serum given 6 hrs. after vaccination only interfered with the first phase IgG production; IgM and second phase IgG remained unaffected (fig. 24). As a byresult this finding appears to show that the induction of first phase IgG synthesis took place after completion of IgM-induction. When a group of previously immunized animals, in which serum antibody had fallen to low levels, were additionally given hyperimmune serum 24 hrs. before the second *Salmonella java* vaccination, a completely normal secondary response

with predominant IgG production from the very beginning was observed (fig. 33).

In accordance with many other investigators it was concluded that the immediate availability and accessibility of IgG AFCP's of such affinity as surpassing that of circulating -hyperimmune- antibody may constitute an acceptable operational definition of a secondary response antibody formation.

On the assumption that these IgG-memory AFCP's had been produced by germinal centers evoked by the primary antigen injection hypothesis seems reasonably justified that - germinal center - reactions induced by a given antigen produce IgM-AFCP's with random specificity, but IgG-AFCP's with a spectrum of specificities directly related to the priming antigen and with high or even progressively higher affinity towards this antigen.

In addition it may be firstly remarked that in the primary response the precursor cells for the first phase IgG-production are of very low affinity, supporting the hypothesis that these cells represent "memory cells", to weakly related previous antigenic contacts. Secondly these observations clearly suggest that the primary response second phase IgG-production apparently is by cells of relatively high affinity. Consequently they may represent IgG-memory AFCP's, the production of which is elicited by the primary injection itself, presumably in the newly evoked germinal center reactions.

Role of T- and B-cells in memory production and secondary antibody response - Chapter V.

Immunological memory regarding antibody formation may be defined as the antigen-induced change in the composition of the population of immunologically competent cells involving proliferation and/or differentiation of cells with antigen related specificities. The two main objectives of this part of our investigations were: does memory production need T-B-cell interaction (i) and does memory exist in both the T- and the B-cell population (ii).

The effects of anti-theta or anti H2 serum (RAFF 1970, TAKAHASHI c.s. 1970, MILLER & SPRENT 1971) have shown that T-cells are involved in immunological memory. Experiments by MITCHISON (1971) with a carrier-hapten system in addition have demonstrated that the

memory-type change in the T-cell population could be induced in lethally irradiated, thymocyte reconstituted mice, i.e. in the absence of B-cells.

B-cell memory proper has not been established beyond doubt, but THORBECKE c.s. (1962) have implicitly suggested that germinal center reactions would be responsible for the generation of B-memory cells. WAKSMAN c.s. (1962) and VELDMAN (1970) have shown that the induction of germinal centers is not impaired in T-cell deprived animals.

Secondary response antibody formation has been tentatively used as the parameter for immunological memory in our experiments; the implications of this procedure will be discussed later.

To test the need for T-B-cell interaction in *establishing* immunological memory a group of four T-cell deprived - adult thymectomized and $3 \times$ irradiated - rabbits received a first Salmonella java vaccination (i.v. + s.c.) 12 weeks after the last irradiation. Four weeks later these animals were each given a dose of anti-Salmonella hyperimmune serum and 24 hrs. later $2 \cdot 10^7$ vital lymphnode cells from donor rabbits, immunized with Salmonella java (i.v. + s.c.) while lacking B-cells i.e. 48 hrs. after the last of 3 whole body X-irradiations with the thymus shielded. These donor animals in addition had been given a dose of hyperimmune serum 24 hrs. after the immunization to prevent later immunization of regenerating B-cells by persisting antigen. The 2nd Salmonella java vaccination was given simultaneously with the lymphnode cells which presumably contained immunized T-cells. The resulting titer course (fig. 36) has the typical characteristics of a secondary response: a rapid rise of IgG antibody, parallel to IgM and unimpaired by circulating hyperimmune antibody.

Two control experiments were performed. First the lymphnode cell donors were tested for antibody formation after regeneration of B-cells. No rise of serum antibody was found in any of these animals during 15 days after vaccination (fig 35). Secondly the possibility that the presumably "secondary response" IgG in fact would represent aspecifically induced "primary response" IgG due to an allogenic effect of the transferred lymph node cells (ЕКРАНА-МЕНСАХ & KENNEDY 1971) was checked. 3 Normal non-immunized

rabbits were given a dose of anti-Salmonella hyperimmune serum; 24 hrs. later they received 6×10^7 lymphnode cells of equally normal, non-immunized donors simultaneously with a standard dose of Salmonella vaccine. Serum titers of these recipients (fig. 34) did not show any stimulation of first phase IgG production, which in fact was lacking like in similarly treated animals not receiving allogenic cells. A last appropriate check was the absence of "secondary response"-type (i.e. rapid IgG antibody formation) (fig. 39) in revaccinated T-cell deprived animals in the next experimental series.

To further test the existence of memory in the T-cell and B-cell populations respectively, the next three experiments were done.

First the (ten) T-cell immunized rabbits that served as lymph node cell donors in the previous experiment, were tested as to their capacity to exhibit a secondary response according to the operational definitions described before. 5 Weeks after the (T-cell immunizing) vaccinations 5 animals of this group were subjected to local irradiation of the spleen; 5 days later they were intravenously given Salmonella java vaccine followed after 6 hrs. by a dose of hyperimmune serum. The remaining 5 animals received hyperimmune serum and 24 hrs. later Salmonella vaccine. Neither of these two groups of animals (fig. 37 and 38) gave a secondary response-type of titer course, but a characteristic primary response pattern as observed under control conditions (cf. fig. 24 and 32). It may be concluded that in these rabbits, which in the previous experiment were shown to possess T-cell memory, the B-cell system following recovery from irradiation damage could not express this memory as a typical "secondary response" type of antibody formation. In combination with the previous experiment this result clearly demonstrates that B-memory is essential for T-memory expression.

The reverse situation was examined in the second experiment. The seven T-cell deprived animals - thymectomized and $3 \times$ irradiated - that had been used in the experiments of chapter III and had received a primary Salmonella java immunization 4, 6 or 16 weeks after the last irradiation, were given a second vaccination with Salmonella 4 weeks later. No local irradiation of the spleen or passive

administration of hyperimmune serum was applied so as not to interfere with any antibody formation at all. The titer curve (fig. 39) shows high IgM-titers; 4 out of 5 animals surviving for 3 weeks had low IgG-titers. It can be concluded that these animals, which may be assumed to possess B-cells, having the capacity to react on T-memory cell reconstitution with a typical secondary response, apparently needed T-cell cooperation for this type of expression. A control group of 3 animals (3 x) irradiated with the thymus shielded, first vaccinated 8 weeks after the last irradiation and 4 weeks later receiving a second *Salmonella* vaccination 24 hrs. after a dose of hyperimmune serum, presented a characteristic secondary response type titer curve (fig. 40).

The remaining question, whether B-cell memory needs T-memory for its expression as a secondary response, was tested in the third experiment but could not be answered definitely. 2 Animals, thymectomized and 3 x irradiated, were first immunized (*Salmonella* vaccine i.v. + s.c.) 6 weeks after the last irradiation. 4 Weeks later these two animals were given a dose of hyperimmune serum and after 24 hrs. they received 10^9 vital normal rabbit (allogenic) thymocytes together with the second injection of *Salmonella* vaccine. One animal (fig. 41) gave a typical primary response type antibody formation, with IgM and second phase IgG only; the other (fig. 42) showed only IgM production. Though the former result suggests that non-immune T-cells will mediate a primary response type antibody formation only, the experimental proof is evidently insufficient.

The following observation, made possible by accident, may be added. In experimental series, not to be published here, thymectomized and 3 x irradiated rabbits were given allogenic skin grafts. In two of these animals the skin graft was rejected some 7 weeks after the last irradiation, possibly through beginning regeneration of the T-cell population due to incomplete thymectomy. *Salmonella java* vaccination 3 weeks later elicited only IgM-antibody and apparently did not induce memory in one animal and dubious memory in the other as shown by a second *Salmonella*-vaccination following local irradiation of the spleen (fig. 43). A third *Salmonella* injection, 10 weeks later, 24 hrs. after a dose hyperimmune serum elicited typical secondary responses in both animals (fig. 44).

From these experiments together it is concluded that:

- a. IgG synthesis during secondary response antibody formation is thymus-dependent like primary response IgG formation;
- b. memory-type changes could be demonstrated in both the T- and the B-cell population;
- c. no T-B interaction is needed for the establishment of either of these memory-type changes;
- d. T-memory can be expressed as secondary response antibody formation only through B-memory cells; secondary response IgG-formation by B-memory cells would seem to be possible through mediation by T-memory cells only.

Taken together the results of this investigation suggest the following hypothetical model of precursor cell kinetics and immunological memory.

The production of IgG-AFCP's, presumably in germinal center reactions, is restricted to cells with specificities related to the antigens inducing these reactions. The change in composition of the population of IgG precursors thus obtained may be named IgG-memory, i.e. the IgG class of B-cell memory. This type of memory can be expressed only by T-B cell interaction - both in the *primary* and in the *secondary* response to a given antigen. In the primary response the first phase, low affinity IgG production would seem to represent B-cell (IgG) memory towards earlier contacts with cross-reacting antigens; the second phase, high affinity IgG formation, may be by AFCP's newly formed in the germinal centers induced by, and having specificities of, the particular antigen involved. These latter AFCP's accumulate to enable a characteristic rapid secondary response-type IgG-production upon a second contact with the same antigen to induce the production.

The production of IgM-AFCP's of random specificity in germinal centers as described by NIEUWENHUIS (1971) would thus seem to accompany the production of highly specific IgG-precursors induced by a wide range of antigens. IgM-, IgG- and possibly other classes of AFCP's would thus, all of them, represent the B2-cells of NIEUWENHUIS, B1-cells representing the directly bone marrow derived precursor population for antigen induced germinal center reactions.

In a similar way the thymocytes might represent T1-population

of precursors, from which, upon antigenic contact, cells of an appropriate range of specificities develop into T2-helper-cells. This process may or may not necessarily involve proliferation. If so it might be represented by the "mitotic response of thymus derived cells" (DAVIES c.s. 1966) as observed in the thymus dependent areas of the spleen and lymph nodes. The antigen induced appearance of T2-helper-cells would represent T-memory.

Both B1- and T1-cells in this concept implicitly already possess specificity - the respective populations possessing "diversity" - as both types of cells apparently are antigen-sensitive.

Lastly some speculations may be ventured concerning the interaction between T-cells and B-cells leading to plasmacell transformation and antibody formation by these latter. It should be remembered that antigen-induced proliferation of B-cells - leading to B2-cells - is possible without the help of T-cells, demonstrating that B1-cells are antigen reactive. This observation strongly suggests that the T-helper-cell-function consists of impairing a change to the B-cell antigen complex. This would be in accordance with the surveillance concept as specified by KRETH and WILLIAMSON (1971). Attention should be given to the role of the T-cell in establishing an "inducing antigen configuration" on the B-cell membrane leading to plasmacell transformation and antibody production.

The biological importance of T- and B-cell interaction might be the prevention, through the constantly high specificity of the T2-cell, of uncontrolled and unrestricted induction of previously formed B-cells towards the production of widely cross-reacting antibody.

LITERATUURLIJST

- ADA, G. L. and BYRT, P. - Specific inactivation of antigen reactive cells with I^{125} labeled antigen. *Nature*, 1969, 222, 1291.
- ARCHER, O. K. and PIERCE, J. C. - Role of thymus in development of the immune response. *Fed. Proc.* 1961, 20, 26.
- ARCHER, O. K., PIERCE, J. C., PAPERMASTER, B. W. and GOOD, R. A. - Reduced antibody response in thymectomized rabbits, *Nature*, 1962, 195, 191.
- ARCHER, O. K., PAPERMASTER, B. W. and GOOD, R. A. - Appendix of the rabbit: a homologue of the bursa in the chicken? *Nature*, 1963, 200, 337.
- ARNASON, B. G., JANKOVIC, B. D., WAKSMAN, B. H. and WERNERSTEN, C. - Role of the thymus in immune reaction in rats. II. Suppression effect of thymectomy at birth on reactions of delayed (cellular) hypersensitivity and the recirculating small lymphocyte. *J. Exp. Med.*, 1962, 116, 177.
- AUERBACH, R. - Thymus: its role in lymphoid recovery after irradiation. *Science*, 1963, 139, 1061.
- BARCHILON, J. and GERSHON, R. K. - Synergism between thymocytes and bone-marrow derived cells in graft-versus-host disease. *Fed. Proc.*, 1970, 29, 430.
- BASTEN, A., MILLER, J. F. A. P., WARNER, N. L. and PYE, J. - Lymphocyte inactivation. Specificity of I^{125} labelled antigen to thymus derived and non-thymus derived lymphocytes. *Nature*, 1971, 231, 104.
- BING, D. H., WEYAND, J. G. M. and STAVITSKY, A. B. - Hemagglutination with aldehyde fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 1967, 124, 1166.
- BOAK, J. L., MITCHISON, N. A. and PATTISON, P. H. - The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. III. The anatomical distribution of helper cells and antibody-forming-cell precursors. *Eur. J. Immunol.*, 1971, 1, 63.
- BOS, W. H. - Recirculatie en transformatie van lymfocyten. *Acad. These*, 1967, Groningen, Nederland.
- BOSMAN, C. and Feldman, J. D. - Cytology of immunologic memory. A morphologic study of lymphoid cells during the anamnestic response. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 293.
- BOYDEN, S. V. - The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 1951, 93, 107.
- BRETSCHER, P. A. and COHN, M. - Minimal model for the mechanism of antibody induction and paralysis by antigen. *Nature*, 1968, 220, 441.
- BRITTON, S., MITCHISON, N. A. and RAJEWSKY, K. - The carrier effect in the secondary response to hapten protein conjugates. IV. Uptake of antigen in vitro and failure to obtain coöperative induction in vitro. *Eur. J. of Immunol.*, 1971, 1, 65.
- BROEK, VAN DEN A. A. - Immune suppression and histophysiology of the immune response. *Acad. Thesis*, 1971, Groningen, The Netherlands.
- BUCHEM, VAN F. I. - Histologisch onderzoek van de plasma cellulaire reaktie en zijn plaats in de histofysiologie van de lymfklier. 1962, Groningen.

- BUTLER, W. T. and COONS, A. H. - Studies on antibody production. XII. Inhibition of priming by drugs. *J. Exp. Med.*, 1964, 120, 1051.
- BYRD, W. - Restoration of the immune response to sheep erythrocytes by a serum factor. *Nature*, 1971, 231, 280.
- BYRT, P. and ADA, G. L. - An in vitro reaction between labeled flagellin or haemocyanine and lymphocyte like cells from normal animals. *Immunology*, 1969, 17, 503.
- CANTOR, H., ASOFSKY, R. and TALAL, N. - Synergy among lymphoid cells mediating the graft-versus-host response. I. Synergy in graft-versus-host reactions produced by cells from NZB/BL mice. *J. Exp. Med.*, 1970, 131, 223.
- CANTOR, H. and ASOFSKY, R. - Synergy among lymphoid cell mediating the graft-versus-host response. II. Synergy in graft-versus-host reactions produced by BALB/C lymphoid cells of differing anatomic origin. *J. Exp. Med.*, 1970, 131, 235.
- CELADA, F. - Quantitative studies of the adaptive immunological memory in mice. II. Linear transmission of cellular memory. *J. Exp. Med.*, 1967, 125, 199.
- CELADA, F., SCHMIDT, D. and STROM, R. - Determination of avidity of antialbumine antibodies in the mouse. Influences of the number of cells transferred on the quality of the secondary adaptive response. *Immunology*, 1969, 17, 189.
- CHASE, M. W. - Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1946, 61, 257.
- CHILLER, J. M., HABICHT, G. S. and WEIGLE, W. O. - Cellular sites of immunologic unresponsiveness. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington)*, 1970, 65, 551.
- CLAMAN, H. N., CHAPERON, E. A. and TRIPLETT, R. F. - Immuno-competence of transferred thymus marrow-cell-combinations. *J. of Immunology*, 1966 97, 828.
- CLAMAN, H. N., CHAPERON, E. A. and TRIPLETT, R. F. - Thymus-marrow cell combinations synergism in antibody production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, 122, 1167.
- COHEN, M. W. and THORBECKE, G. J. - Specificity of reaction to antigenic stimulation in lymphnodes of immature rabbits. II. Suppression of local morphologic reactions to alum precipitated bovine serum albumine by intra peritoneal injections of soluble bovine serum albumine in neonatally rabbits. *J. Immunol.*, 1964, 93, 629.
- COHEN, E. P. and TALMAGE, D. W. - Onset and duration of DNA synthesis in antibody forming cells after antigen. *J. Exp. Med.*, 1965, 121, 125.
- COHEN, M. W., JACOBSON, E. B. and THORBECKE, G. J. - γ Globulin and antibody formation in vitro. V. The secondary response made by splenic and red pulp with reference to the role of the secondary nodules. *J. Immunol.*, 1966, 96, 944.
- COOMBS, R. R. A., FEINSTEIN, A. and WILSON, A. B. - Immunoglobulin determinants on the surface of human lymphocytes. *Lancet*, 1969, II, 1157.
- COOMBS, R. R. A., GURNER, B. W. and JANEWAY, C. A., WILSON, A. B., SELL, P. G. H. and KELUS, A. S. - Immunoglobulin determinants on the lymphocytes of normal rabbits. I. Demonstration by the mixed anti-globulin reaction of determinants recognized by anti- γ -anti- μ anti Fab and anti-allotype sera anti-AS₄ and anti-AS₆. *Immunology*, 1970, 18, 423.
- COSENZA, H. and NORDIN, A. A. - Immunoglobulin classis of antibody forming cells in mice. III. Immunoglobulin antibody restriction of plaque forming cells demonstrated by the double-immunofluorescent technique. *J. Immunol.*, 1970, 104, 976.

- COTTIER, H., KEISER, G., ODARTCHENKO, N. and STONER, R. D. - De novo formation and rapid growth of germinal centers during secondary antibody responses to tetanus toxoid in mice. In: *Germinal Centers in Immune Responses*, 270. Eds.: H. Cottier, N. Odartchenko, R. Schindler and C. C. Congdon. Springer Verlag New York, 1967.
- CROSS, A. M., LEUCHARS, E. and MILLER, J. F. A. P. - Studies on the recovery of the immune response in irradiated mice thymectomized in adult life. *J. Exp. Med.*, 1964, 119, 837.
- CUNNINGHAM, A. J. - Studies on the cellular basis of IgM immunological memory. The induction of antibody formation in bone marrow cells by primed spleen cells. *Immunology*, 1969, 17, 933.
- DAVIES, A. J. S., LEUCHARS, E., WALLIS, V. and KOLLER, P. C. - The mitotic response of thymus derived cells to antigenic stimulus. *Transplantation*, 1966, 4, 438.
- DAVIES, A. J. S., LEUCHARS, E., WALLIS, V., MARCHANT, R. and ELLIOT, E. V. - The failure of thymus derived cells to produce antibody. *Transplantation*, 1967, 5, 222.
- DAVIES, A. J. S., CARTER, R. L., LEUCHARS, E., WALLIS, V. and DIETRICH, F. M. - The morphology of immune reactions in normal thymectomized and reconstituted mice. III. Response to bacterial antigens: Salmonella flagellar antigen and pneumococcal polysaccharide. *Immunology*, 1970, 19, 945.
- DUKOR, P., DIETRICH, F. M. and ROSENTHAL, N. - Recovery of immunological responsiveness in thymectomized mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 1966, 1, 398.
- EISEN, H. N. and SISKIND, G. W. - Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry*, 1964, 3, 996.
- EISEN, H. N., SIMMS, E. S. and POTTER, M. - Mouse myeloma proteins with anti hapten antibody activity. The protein produced by plasma cell. Tumor MOPC-315. *Biochemistry*, 1968, 7, 4126.
- EKPAKA-MENSAH, A. and KENNEDY, J. C. - New indicator of histocompatibility differences in vitro. *Nature*, 1971, 233, 174.
- ELLIS, S. T., GOWANS, J. L. and HOWARD, J. C. - The origin of antibody forming cells from lymphocytes. *Antibiotica et Chemotherapia*, 1969, 15, 40, Karger, Basel/New York.
- FAGREUS, A. - Antibody production in relation to the development of plasma cells. In vivo and in vitro experiments. *Acta Med. Scand.*, 1948, 130, 204.
- FELDMAN, M. and GALLILY, R. - Cell interactions in the induction of antibody formation. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Vol. XXXII, 343. New York: Cold Spring Harbor 1968.
- FELDMAN, M. and DIENER, E. - Antibody mediated suppression of the immune response. I. Evidence for a central effect. *J. Exp. Med.* 1970, 131, 297.
- FELDMAN, M. and BASTEN, A. - The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus derived cells in the immune response. *J. Exp. Med.*, 1971, 134, 103.
- FICHTELIUS, K. E., LAURELL, G. and PHILIPSSON, L. - The influence of thymectomy on antibody formation. *Acta. Path et Microb. Scand.*, 1961, 51, 81.
- FINEGOLD, I., FAHEY, J. L. and GRANGER, H. - Synthesis of immunoglobulins by human cell lines in tissue culture. *J. Immunol.*, 1967, 99, 839.
- FINKELSTEIN, M. S. and UHR, J. W. - Specific inhibition of antibody formation by passively administered 19S and 7S antibody. *Science*, 1964, 146, 67.
- FISHMAN, M. - Antibody formation in tissue culture. *Nature*, 1959, 183, 1200.
- FISHMAN, M. - Antibody formation in vitro. *J. Exp. Med.*, 1961, 114, 837.

- FISHMAN, M. and ADLER, F. L. - Antibody formation initiated in vitro. II. Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen. *J. Exp. Med.*, 1963, 117, 595.
- FORD, W. L. - The kinetics of lymphocyte recirculation within the rat spleen. *Cell and Tissue Kinetics*, 1969, 2, 171.
- GALLILY, R. and FELDMAN, M. - The role of macrophages in the induction of antibody in X-irradiated animals. *Immunology*, 1967, 12, 197.
- GALLY, J. A. and EDELMAN, G. M. - Somatic translocation of antibody genes. *Nature*, 1970, 227, 341.
- GERSHON, R. K. and PAUL, W. E. - Effect of thymus-derived lymphocytes on amount and affinity of anti-hapten antibody. *J. Immunol.*, 1971, 106, 872.
- GLENNY, A. T. and SUDMERSEN, H. J. - Notes on the production of immunity to diphtheria toxin. *The Journal of Hygiene*, 1921, 20, 205.
- GLICK, B., CHANG, T. S. and JAAP, R. G. - The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Sci.*, 1956, 35, 224.
- GLOBERSON, A., FIORE-DONATI, L. and FELDMAN, M. - On the role of the thymus in recovery of immunological reactivity following X-irradiation. *Exp. Cell. Res.*, 1962, 28, 455.
- GOOD, R. A. and CAIN, W. A. - Relationship between thymus dependent cells and humoral immunity. *Nature*, 1970, 226, 1256.
- GOWANS, J. L. and MCGREGOR, D. D. - The immunological activities of lymphocytes. *Progress in Allergy* 1965, 9, 1. Karger Basel/New York.
- GOWANS, J. L. and UHR, J. W. - The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat. *J. Exp. Med.*, 1966, 124, 1017.
- GREAVES, M. F. and HOGG, N. M. - Antigen Binding Sites on Mouse lymphoid cells: Relationship to the immune response. In: *Cell interactions and Receptor antibodies in immune responses*. Proc. of the Third Sigrid Jusélius Symposium, 1971, Ed. O. Mäkelä, A. Cross and T. U. Kosunen. Acad. Press. London/New York.
- HANAOKA, M., NOMOTO, K. and WAKSMAN, B. H. - Appendix and γ -M antibody formation. I. Immune response and tolerance to bovine γ -globulin in irradiated, appendix-shielded rabbits. *J. of Immunol.*, 1970, 104, 616.
- HAMAOKA, T., TAKATSU, K., MATSUOKA, Y. and KITAGAWA, M. - Antibody production in mice. III. The suppressive effect of antibody on the initiation of secondary immune response. *Immunol.*, 1971, 20, 871.
- HARRIS, J. E. and FORD, C. E. - The role of the thymus migration of cells from thymic grafts to lymphnodes in mice. *Lancet*. 1963, 1, 389.
- HARRIS, J. E. and FORD, C. E. - Cellular traffic of the thymus: experiments with chromosome markers. Evidence that the thymus plays an instructional part. *Nature*, 1964, 201, 884.
- HASKILL, J. S. - Density distribution analysis of antigen sensitive cells in the rat. *J. Exp. Med.*, 1969, 130, 877.
- HENRY, C. and JERNE, N. K. - Competition of 19S and 7S receptors in the regulation of the primary immune response. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 133.
- HESS, M. W., COTTIER, H. and STONER, R. D. - Primary and secondary antitoxin responses in thymectomized mice. *J. Immunology*, 1963, 91, 425.
- HURLIMANN, J., WAKEFIELD, J. D. and THORBECKE, G. J. - The effects of immuno suppressant drugs administered during germinal center proliferation on preparation of a secondary response. In: *Germinal Centers and the Immune Resonse*, 225. H. Cottier, N. Odartchenko, R. Schindler and C. C. Congdon ed. Springer-Verlag, New York, 1967.
- IPSEN, J. - Differences in primary and secondary immunizability of inbred mice strains. *J. Immunol.*, 1959, 83, 448.

- JACOBSON, E. B. and THORBECKE, G. J. - Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunological memory. III. Proliferative response of primed cells from splenic white and red pulp following reexposure to antigen in vitro. *J. Immunol.*, 1968, 101, 515.
- JACOBSON, E. B., L'AGE-STEHR, J. and HERZENBERG, L. A. - Immunological memory in mice II. Cell interactions in the secondary immune response studied by means of immunoglobulin allotype markers. *J. Exp. Med.*, 1970, 131, 1109.
- JANKOVIC, B. D., WAKSMAN, B. H. and ARNASON, B. G. - Role of the thymus in immune reactions in rats. I. The immunologic response to bovine serum albumin (antibody formation, Arthus reactivity and delayed hypersensitivity) in rats thymectomized or splenectomized at various time after birth. *J. Exp. Med.*, 1962, 116, 159.
- JAROSLOW, B. N. and NOSSAL, G. J. V. - Antigen localisation in lymph nodes of X-irradiated rats. *Fed. Proc.*, 1966, 25, 612.
- JERNE, N. K., NORDIN, A. A. and HENRY, C. - The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells. In: *Cell Bound antibodies*, 1963, 109. Edited by B. Amos and H. Koprowski, Wistar Institute Press, Philadelphia.
- JERNE, N. K. - The somatic generation of immune recognition. *Eur. J. Immunol.*, 1971, 1, 1.
- KAPPLER, J. W., HOFFMAN, M. and DUTTON, R. W. - Regulation of the immune response. I. Differential effect of passively administered antibody on the thymus-derived and bone-marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1971 134, 577.
- KATZ, D. H., PAUL, W. E., GOIDL, E. A. and BENACERRAF, B. - Carrier funktion in anti-hapten antibody responses. III. Stimulation of antibody synthesis and facilitation of hapten-specific secondary antibody responses by graft-versus-host reactions. *J. Exp. Med.*, 1971, 133, 169.
- KATZ, D. H., PAUL, W. E. and BENACERRAF, B. - Carrier function in anti-hapten antibody responses. V: analysis of cellular events in the enhancement of antibody responses by the „allogeneic effect” in DNP-OVA-Primed Guinea Pigs challenged with a heterologues DNP-conjugate. *J. Immunol.*, 1971, 107, 1319.
- KEUNING, F. J., MEER, J. v. d., NIEUWENHUIS, P. and OUDENDIJK, P. - The histophysiology of the antibody response. II. Antibody responses and splenic plasma cell reactions in sublethally X-irradiated rabbits. *Lab. Invest.*, 1963, 12, 156.
- KEUNING, F. J., DIJKHUIS, A. and DIJKSTRA-v. d. VLIET, Th. A. - The effect of sublethal röntgen irradiation on the induction period of the antibody response in the rabbit. *Int. J. of Rad. Biol.*, 1964, 8, 279.
- KEUNING, F. J., NIEUWENHUIS, P., MULDER, N. H. and HOEKSTRA, G. R. - Histophysiological patterns of antibody formation. *International Symposium on adjuvants of immunity Utrecht. Symp. Series immunobiol. Standard*, 1967., 6, 183. Karger Basel/New York.
- KEUNING, F. J. and v. d. BROEK, A. A. - Zone cells of lymphoid follicles in the immune response of rabbits. *Exp. Haematology*, 1968, 17, 4.
- KETTMAN, J. and DUTTON, R. W. - An in vitro primary immune response to T.N.P. substituted erythrocytes. Response against carrier and hapten. *J. Immunol.*, 1970, 104, 1558.
- KETTMAN, J. and DUTTON, R. W. - Radioresistance of the enhancing effect of cells from carrier immunized mice in an in vitro primary immune response. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1971, 68, 1971.
- KINCADE, P. W., LAWTON, A. R., BOCKMAN, D. E. and COOPER, M. D. - Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens. *Proc. Nat. Acad. of Sci.*, 1970, 67, 1918.

- KRETH, H. W. and WILLIAMSON, A. R. - Cell surveillance Model for lymphocyte cooperation, *Nature*, 1971, 234, 454.
- LEDUC, E. H., COONS, A. H. and CONNOLLY, J. M. - Studies on antibody production. II. The primary and secondary response in the popliteal lymph-node of the rabbit. *J. Exp. Med.*, 1955, 61, 102.
- LESLEY, J. F., KETTMAN, J. R. and DUTTON, R. W. - Immunoglobulins on the surface of thymus-derived cells engaged in the initiation of a humoral immune response. *J. Exp. Med.*, 1971, 134, 618.
- LEVINE, B. - Specificity of the anamnestic response to a double hapten conjugate in quinea pigs primed with a single hapten. *J. Immunol.*, 1967, 99, 1173.
- LEUCHARS, E., CROSS, A. M., DAVIES, A. J. S. and WALLIS, V. J. - A cellular component of thymic function. *Nature*, 1964, 203, 1189.
- LEUCHARS, E., CROSS, A. M. and DUKOR, P. - The restoration of immunological function by thymus grafting in thymectomized irradiated mice. *Transplantation*, 1965, 3, 28.
- LEUCHARS, E., DAVIES, A. J. S., WALLIS, V. and KOLLER, P. C. - Further studies upon the mitotic response of thymus derived cells to antigenic stimulus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1966, 129, 274.
- LEUCHARS, E., WALLIS, V. and DAVIES, A. J. S. - Mode of action of anti-lymphocyte serum. *Nature*, 1968, 219, 1325.
- LISCHNER, H. W., PUNNETT, H. H. and DI GEORGE, A. M. - Lymphocytes in congenital absence of the thymus. *Nature*, 1967, 214, 580.
- LISCHNER, H. W. and DI GEORGE, A. M. - Role of the thymus in humoral immunity. Observations in complete or partial congenital absence of the thymus. *Lancet*, 1969, 11, 1045.
- LITTLE, J. R. and EISEN, H. N. - Specificity of the immune response to the 2,4 dinitro-phenyl and 2, 4, 6 trinitro phenyl groups. Ligand binding and fluorescence properties of cross reacting antibodies. *J. Exp. Med.*, 1969, 129, 247.
- LUBAROFF, D. M. and WAKSMAN, B. H. - Bone marrow as source of cells in reactions of cellular hypersensitivity in syngeneic systems. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 1425.
- LUBAROFF, D. M. and WAKSMAN, B. H. - Bone marrow as source of cells in reactions of cellular hypersensitivity. II. Identification of allogeneic or hybrid cells by immuno fluorescence in passively transferred tuberculin reactions. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 1437.
- MAKINODAN, T., KARSTENBAUM, M. A. and PETERSON, W. J. - Radio-sensitivity of spleen cells from normal and preimmunized mice and its significance to intact animals. *J. Immunol.*, 1962, 88, 31.
- MAKINODAN, T., SADO, T., GROVES, D. L. and PRICE, G. - Growth patterns of antibodyforming cell populations. *Curr. Top. Microbiol. Immun.*, 1969, 49, 80.
- MILLER, J.F. A. P. - Immunological function of the thymus. *Lancet*, 1961, 1, 748.
- MILLER, J. F. A. P. - Role of the thymus in transplantation immunity. *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, 1962, 99, 340.
- MILLER, J. F. A. P. - Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. Roy. Soc. B. (London)*, 1962, 156, 415.
- MILLER, J. F. A. P. - Immunity and the thymus. *Lancet*, 1963, 1, 43.
- MILLER, J. F. A. P. - Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature*, 1965, 208, 1337.
- MILLER, J. F. A. P. - In: *Immunological tolerance; A reassessment of mechanisms of the immune response*. Ed. Landy M. and Braun W. Acad. Press. New York/London, 1969, 131.

- MILLER, J. F. A. P. - Interaction between T-cells and B-cells in humoral antibody responses. In: Morphological and functional aspects of immunity. *Advances in Exp. Med. and Biol.*, 1971, 12, 93. Eds. K. Lindahl-Kiessling, G. Alm and M. G. Hanna Jr. Plenum Press New York-London 1971.
- MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F. - Cell to cell interaction on the immune response. I. Hemolysin forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 801.
- MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F. - Interaction of two distinct cell lineages in an immune response. In: Lymphatic tissue and germinal centers in immune response. *Adv. in Exp. Med. and Biol.*, 1969, 5, 455. Eds. L. Fiore-Donati, M. G. Hanna jr. Plenum Press-New York.
- MILLER, J. F. A. P. and OSOBA, D. - Current concepts of the immunological functions of the thymus. *Physiol. Rev.*, 1967, 47, 437.
- MILLER, J. F. A. P. and SPRENT, J. - Thymus derived cells in mouse thoracic duct lymph. *Nature (London)*, 1971, 230, 267.
- MILLER, J. F. A. P. and SPRENT, J. - Cell to cell interactions in the immune response. VI. Contribution of thymus derived cells and antibody forming cell precursors to immunological memory. *J. Exp. Med.*, 1971, 134, 66.
- MITCHELL, G. F. and MILLER, J. F. A. P. - Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of haemolysin forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 821.
- MITCHISON, N. A. - Antigen recognition responsible for the induction in vitro of the secondary response. In: Cold Spring Harbor Symposia of Quant. Biol., 1967, 32, 431.
- MITCHISON, N. A. - Immunologic approach to cancer. *Transplantation Proceedings*, 1970, 2, 92.
- MITCHISON, N. A. - In: Immunological Tolerance. A reassessment of mechanisms of the immune response. 1969, 124. Eds. M. Landy and W. Braun. Acad. Press New York/London.
- MITCHISON, N. A. - The carrier effect in secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the local effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. *Eur. J. Immunol.*, 1971, 1, 10.
- MITCHISON, N. A. - The carrier effect in secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation. *Eur. J. Immunol.*, 1971, 1, 18.
- MITCHISON, N. A. - The carrier effect in secondary response to hapten-protein conjugates. V. Use of antilymphocyte serum to deplete animals of helper cells. *Eur. J. Immunol.*, 1971, 1, 68.
- MÖLLER, G. and WIGZELL, H. - Antibody synthesis at the cellular level. Antibody induced suppression of 19S and 7S antibody response. *J. Exp. Med.*, 1965, 121, 969.
- MÖLLER, E. and GREAVES, M. F. - On the thymic origin of antigen sensitive cells. In: Cell interactions and receptorantibodies in immune responses, *Proc. of the Third Sigr. Juselius Symposium 1971*, 101. Eds. O. Mäkelä, A. Cross and T. U. Kosunen. Acad. Press London/New York.
- MORRIS, A. and MÖLLER, G. - Regulation of cellular antibody synthesis effect of adoptively transferred antibody producing spleen cells on cellular antibody synthesis. *J. Immunol.*, 1968, 101, 439.
- NEIDERS, M. E., ROWLEY, D. A. and FITCH, F. W. - The sustained suppression of hemolysine response in passively immunized rats. *J. Immunol.* 1962, 88, 718.
- NETTESHEIM, P., MAKINODAN, T. and WILLIAMS, M. L. - Regenerative potential of immuno competent cells I. Lack of secondary antibody forming potential after X-irradiation. *J. Immunol.* 1967, 99, 150.

- NETTESHEIM, P. and HANNA, M. G. Jr. - Radiosensitivity of the antigen trapping mechanism and its relation to the suppression of immune response. In: Lymphatic Tissue and Germinal Centers in Immune Response. Adv. in Exp. Med. and Biol., 1969, 5, 167. Eds. L. Fiori-Donati and M. G. Hanna Jr. Plenum Press New York.
- NETTESHEIM, P. and HAMMONS, A. S. - Recovery of the antigen retention mechanism after sublethal X-irradiation in mice receiving cells from various sources., J. Immunol., 1971, 107, 518.
- NIEUWENHUIS, P. - On the origin and fate of immunologically competent cells. Thesis, Groningen, The Netherlands, 1971.
- NOSSAL, G. J. V. and MÄKELÄ, O. - Autoradiographic studies of the immune response. I. The kinetics of plasmacell proliferation. J. Exp. Med., 1962, 115, 209.
- NOSSAL, G. J. W., SZENBERG, A., ADA, G. L. and AUSTIN, C. M. - Single cell studies on 19S antibody production. J. Exp. Med., 1964, 119, 485.
- NOSSAL, G., AUSTIN, C. and ADA, G. - Antigens in immunity. VII. Analysis of immunological memory. Immunol., 1965, 9, 333.
- NOSSAL, G. J. V., AUSTIN, C. M., PYE, J. and MITCHELL, J. - Antigens in Immunity. XII. Antigen trapping in the spleen. Int. Arch. Allergy, 1966, 29, 368.
- NOSSAL, G. J. V., CUNNINGHAM, A., MITCHELL, G. F. and MILLER, J. F. A. P. - Cell to cell interaction in the immune response. III. Chromosomal marker analysis of single antibody forming cells in reconstituted irradiated or thymectomized mice. J. Exp. Med., 1968, 128, 839.
- NUSSENZWEIG, V., GREEN, I., VASALLI, P. and BENACERRAF, B. - Changes in the proportion of Guinea Pig γ_1 and γ_2 antibodies during immunization and the cellular localisation of these Immunoglobulins. Immunol., 1968, 14, 601.
- OSOBA, D. - Immune reactivity in mice thymectomized soon after birth: normal response after pregnancy. Science, 1965, 147, 298.
- PARROT, D. M. V., DESOUSA, M. A. B. and EAST, J. - Thymus dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. J. Exp. Med., 1966, 123, 191.
- PAUL, W. E., SISKIND, G. W. and BENACERRAF, B. - Specificity of cellular immune responses. Antigen concentration dependence of stimulation of DNA synthesis in vitro by specifically sensitized cells as an expression of the binding characteristics of cellular antibody. J. Exp. Med., 1968, 127, 25.
- PAUL, W. E. and SISKIND, G. W. - Hapten specificity of cellular immune responses as compared with the specificity of serum antihapten antibody. Immunol., 1970, 18, 919.
- PAUL, W. E., STUPP, Y., SISKIND, G. W. and BENACERRAF, B. - Structural control of immunogenicity. IV. Relative specificity of elicitation of cellular immune responses and of ligand binding to anti-hapten antibody after immunization with mono-E-DNP-nona-L-lysine. Immunol., 1971, 21, 605.
- PORTER, R. J. - Studies on antibody formation. Effects of X-irradiation on adaptation for the secondary response of rabbits to bovine γ globuline. J. Immunol., 1960, 84, 485.
- PORTER, R. J. - Temporal studies on suppression by X-ray of adaptation for the secondary antibody response. J. Immunol., 1964, 92, 425.
- PRIBNOW, J. F. and SILVERMAN, M. S. - Studies on the radiosensitive phase of the primary antibody response in rabbits. I. The role of the macrophage. J. Immunol., 1967, 98, 225.
- RABELLINO, E., COLON, S., GREY, H. M. and UNANUE, E. R. - Immunoglobulins on the surface of lymphocytes I. Distribution and quantitation. J. Exp. Med., 1971, 133, 156.

- RAFF, M. C. - The use of surface antigenic markers to define different populations of lymphocytes in the mouse. In: Cell interactions and receptor antibodies in immune responses Proc. of the third Sigrid Jusélius Symposium, 1971, 83. Eds. O. Mäkelä, A. Cross and T. U. Kosunen. Acad. Press London New York.
- RAFF, M. C. - Theta-iso-antigen as a marker of thymus-derived lymphocytes in mice. *Nature (London)*, 1969, 224, 378.
- RAFF, M. C., STERNBERG, M. and TAYLOR, R. B. - Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature*, 1970, 225, 553.
- RAFF, M. C. and WORTIS, H. H. - Thymus dependence of Θ bearing cells in the peripheral lymphoid tissues of mice. *Immunol.*, 1970, 18, 931.
- RAFF, M. C. - Role of thymus derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice. *Nature*, 1970, 226, 1257.
- RAJEWSKY, K. and ROTTLÄNDER, E. - Tolerance specificity and the immune response to lactic dehydrogenase isoenzymes. In: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1967, 32, 547.
- RAJEWSKY, K., SCHIRRMACHER, V., NASE, S. and JERNE, N. K. - The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity., *J. Exp. Med.*, 1969, 129, 1131.
- REIFF, A. E. and ALLEN, J. M. V. - The A.K.R. thymic antigen and its distribution in leukemia and nervous tissues. *J. Exp. Med.*, 1964, 120, 413.
- ROBBINS, J. and SMITH, R. T. - The effect of X-ray irradiation upon the sequence of immuno globulins following initial immunization in the rabbit. *J. Immunol.*, 1964, 93, 1045.
- ROGISTER, G. - Immunologically recovery in neonatally thymectmized swiss albino mice. *Transplantation*, 1965, 3, 669.
- ROITT, I. M., GREAVES, M. F., TORRIGIANI, G., BROSLOFF, J. and PLAYFAIR, J. H. L. - The cellular basis of immunological responses. *Lancet*, 1969, 1, 367.
- ROWLEY D. A. and FITCH, F. W. - Homeostasis of antibody formation in the adult rat. *J. Exp. Med.*, 1964, 120, 987.
- SADO, T. and MAKINODAN, T. - The cell cycle of blast cells involved in secondary antibody response. *J. Immunol.*, 1964, 93, 696.
- SADO, T., PERKINS, E. H. and MAKONIDAN, T. - Staircase rise in the antibody-forming cell population in secondary response. *J. Immunol.*, 1970, 105, 642.
- SELL, S. and GELL, P. H. - Studies on rabbit lymphocytes in vitro I. Stimulation of blast type transformation with an anti allotype serum. *J. Exp. Med.*, 1965, 122, 423.
- SCHLESINGER, M. and YRON, I. -Serological demonstration of a thymus dependent population of lymph node cells. *J. Immunol.*, 1970, 104, 798.
- SCHLESINGER, M. and YRON, I. - Antigenic changes in lymph node cells after administration of antiserum to thymus cells. *Science (Washington)*, 1969, 164, 1412.
- SMITH, R. T. and ROBBINS, J. B. - Studies on mechanisms controlling the immunoglobulin competents of the immune response. In: Molecular and cellular and basis of antibody formation, 1965, 381, Eds. J. Sterzl, Acad. Press. New York and London.
- SCHÜTZE, H. - The optimal spacing of vaccine inoculations. *J. Path. and Bact.*, 1941, 53, 443.
- SCHWARTZ, R., EISNER, A. and DAMESHEK, W. - The effect of 6 mercaptopurine on primary and secondary immune responses. *J. Clin. Invest.*, 1959, 38, 1394.

- SILVERSTEIN, A. M. and PRENDERGAST, R. A. - Lymphogenesis, Immunogenesis and the generation of immunologic diversity. In: Developmental aspects of antibody formation and structure. Acad. Press New York/London, 1970, 69. Eds. J. Sterzl and I. Rika.
- SINCLAIR, N. R. St. C. - Effects of neonatal thymectomy on the haemolysin response to sheep erythrocytes in swiss albino mice. A timecourse study of total 19S and 7S antibody. *Immunol.*, 1967, 12, 549.
- SINCLAIR, N. R. St. C. - A comparison of primary and secondary haemolysin responses to sheep erythrocytes in neonatally thymectomized, sham thymectomized and normal Swiss mice. A time course study of total 19S and 7S antibody. *Immunol.*, 1967, 12, 559.
- SISKIND, G. W., DUNN, P. and WALKER, J. G. - Studies on the control of antibody synthesis. II. Effect of antigen dose and of suppression by passive antibody on the affinity of antibody synthesized. *J. Exp. Med.*, 1968, 127, 55.
- SNYDER, J. A. M. - Experimentele onderzoekingen over immunotolerantie, Acad. These, Groningen, Nederland, 1969.
- STAVITSKY, A. B. - Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of haemagglutination and haemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.*, 1954, 72, 360.
- STAVITSKY, A. B. - Participation of the popliteal lymph node and spleen in the production of diphtheria antitoxine in the rabbit. *J. Inf. Dis.*, 1954, 94, 306.
- STAVITSKY, A. B. - Haemagglutination and haemagglutination-inhibition reaction with tannic acid and bis-diazotized benzidine-proteinconjugated erythrocytes. In: *Immunological Methods*, 1964, 363. Eds. J. F. Ackroyd. Blackwell-Oxford.
- STEINER, L. A. and EISEN, H. N. - Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. *J. Exp. Med.*, 1967, 126, 1161.
- STEVENS, K. M. - Antigen retention in the rabbit. *J. Exp. Med.*, 1953, 97, 247.
- STONER, R. D. and HALE, W. M. - Radiation effects on primary and secondary antibody responses. In: *The effects of ionizing radiations on immune processes*, 1962, 183. Eds. G. A. Leone. Gordon and Breach New York.
- SULZBERGER, M. B. - Hypersensitiveness to neoarsphenamine in guinea pigs: experiments in prevention and in desensitization. *Arch. Dermat. e. Syph.*, 1929, 20, 669.
- SVET-MOLDAWSKY, G. J., ZINZAR, S. N. and SPECTOR, N. M. - Dissociation of the immunological competence in neonatally thymectomized mice and its restoration. *Nature*, 1964, 202, 353.
- TAKAHASHI, M., TAKAGI, N., YAGI, Y., MOORE, G. E. and PRESSMAN, D. - Immunoglobulin production in cloned sublines of a human lymphocytoid cell line. *J. Immunol.*, 1969, 102, 1388.
- TAKAHASHI, T., CARSWELL, E. A. and THORBECKE, G. J. - Surface antigens of immunocompetent cells. I. Effect of Θ and P.C. 1. allo antisera on the ability of spleen cells to transfer immune responses. *J. Exp. Med.*, 1970, 132, 1181.
- TANNENBERG, W. J. K. and MALAVIYA, A. N. - The life cycle of antibody forming cells. I. The generation time of 19S hemolytic plaque forming cells during the primary and secondary responses. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 895.
- TAYLOR, R. B. - Antigen dose and the avidity of antibody from thymectomized mice. In: *Cell interactions and receptor antibodies in immune responses*. Proc. of the third Sigrid Juselius Symp. 1971, 325. Eds., O Mäkelä, A. Cross and T. O. Kosunen. Acad. Press London/New York.
- TAYLOR, R. B. and WORTIS, K. H. - Thymus dependence of antibody response: Variation with dose of antigen and class of antibody. *Nature*, 1968, 228, 927.

- THORBECKE, G. J. - Over de vorming van antilichamen en gammaglobuline „in vitro” in bloedvormende organen. Groningen, 1954.
- THORBECKE, G. J., ASOFSKY, R. M., HOCHWALD, G. M. and SISKIND, G. W. - Gamma globulin and antibody formation in vitro. III. Induction of secondary response at different intervals after the primary. The role of secondary nodules in the preparation for the secondary response. *J. Exp. Med.*, 1962, 116, 295.
- THORBECKE, G. J., JACOBSON, E. B. and ASOFSKY, R. - Gamma globulin and antibody formation in vitro. IV. The effect on the secondary response of X-irradiation given at varying intervals after a primary injection of bovine gamma globulin. *J. Immunol.*, 1964, 92, 734.
- TRAININ, N., LAW, L. W. and LEVEY, R. H. - Patterns of reconstitution of neonatally thymectomized mice by injections of isolated lymphopoietic and hematopoietic cells. *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 1965, 118, 79.
- UHR, J. W. - The heterogeneity of the immune response, *Science*, 1964, 145, 457.
- UHR, J. W. and BAUMANN, J. B. - Antibody formation. I. The suppression of antibody formation by passively administered antibody. *J. Exp. Med.*, 1961, 113, 935.
- UHR, J. W. and BAUMANN, J. B. - Antibody formation. II. The specific anamnestic response. *J. Exp. Med.*, 1961, 113, 959.
- UHR, J. W. and FINKELSTEIN, M. - Antibody formation. IV. Formation of rapidly and slowly sedimenting antibodies and immunological memory to bacteriophage Q x 174. *J. Exp. Med.*, 1963, 117, 457.
- UHR, J. W. and MÖLLER, G. - Regulatory effect of antibody on the immune response. *Advanc. Immunol.*, 1968, 8, 81.
- VELDMAN, J. E. - Histophysiology and Electron Microscopy of the Immune Response., *Acad. Thesis*, Groningen, The Netherlands, 1970.
- WAKEFIELD, J. D., COHEN, M. W., MCCLUSKEY, J. and THORBECKE, G. J. - The fate of lymphoid cells from the white pulp at the peak of germinal center formation. In: *Germinal Centers in Immune Responses*, 1967, 183. Eds. H. Cottier, N. Odartchenko, R. Schindler and C. C. Congdon. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- WAKEFIELD, J. D. and THORBECKE, G. J. - Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunological memory. I. Evidence for the formation of small lymphocytes upon transfer of primed splenic white pulp to syngeneic mice. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 153.
- WAKEFIELD, J. D. and THORBECKE, G. J. - Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunological memory. II. The detection of primed cells and their proliferation upon cell transfer to lethally irradiated syngeneic mice. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 171.
- WANG, A. C., WILSON, S. K., HOPPER, J. E., FUDENBERG, H. H. and NISONOFF, A. - Evidence for the control of synthesis of the variable regions of the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene. *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences.*, 1970, 66, 337.
- WAKSMAN, B. H., ARNASON, B. G. and JANCOVIC, B. D. - Role of the thymus in immune reactions in rats. III. Changes in the lymphoid organs of thymectomized rats. *J. Exp. Med.*, 1962, 116, 187.
- WALKER, J. G. and SISKIND, G. W. - Studies on the control of antibody synthesis. Effect of antibody affinity upon its ability to suppress antibody formation. *Immunol.*, 1968, 14, 21.
- WEISSMAN, I. L. - Thymus cell migration, *J. Exp. Med.*, 1967, 126, 191.
- WIGZELL, H. - Antibody synthesis at the cellular level. Antibody-induced suppression of 7S synthesis. *J. Exp. Med.*, 1966, 124, 953.
- WIGZELL, H. and ANDERSSON, B. - Cell separation on antigen-coated columns elimination of high rate antibody forming cells and immunologically memory cells. *J. Exp. Med.*, 1969, 129, 133.

- WILLIAMS, G. M. - Antigen localization in lymphophenic states. I. Localization pattern following chronic thoracic duct drainage. *Immunol.*, 1966, 11, 467.
- WILLIAMS, G. M. - Antigen localization in lymphophenic states. II. Further studies on whole body X-irradiation. *Immunol.*, 1966, 11, 475.
- WHITE, R. G. - Factors affecting the antibody response, *Brit. Med., Bull.*, 1955, 61, 102.
- WHITE, R. G. - Functional recognition of immunologically competent cells by means of the fluorescent antibody technique. In: *The immunological competent cell: its nature and origin*. CIBA found. Study Group, 1963, 16, 6. Eds. G. E. W. Wolstenholme and J. Knight, Churchill - London.
- YUNIS, E. J., HILGARD, H., SJODIN, K., MARTINEZ, C. and GOOD, R. A. - Immunological reconstitution of thymectomized mice by injection of isolated thymocytes. *Nature*, 1964, 201, 784.

